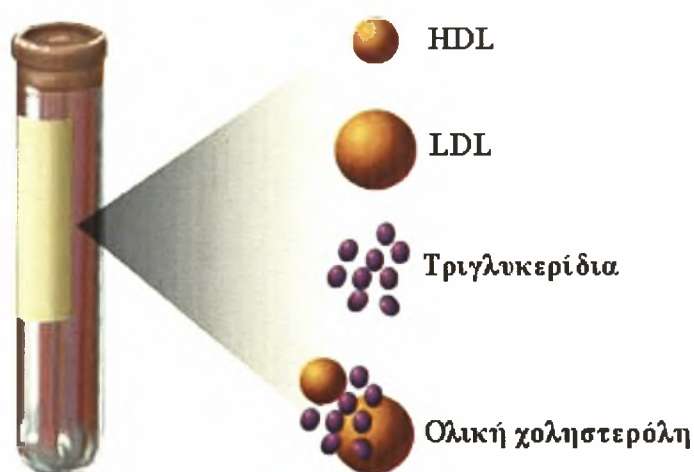


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**Γονιδιακή μελέτη του παράγοντα ομοιόστασης της ενέργειας του
μεταβολικού συνδρόμου στον ελληνικό πληθυσμό**



ΓΚΟΥΤΖΕΛΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8097/1
Ημερ. Εισ.: 23-03-2010
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
571.944
ΓΚΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087115

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ	
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ	
Αριθ. Πρωτ.	14
Ημερομηνία	16-2-10

**“Γονιδιακή μελέτη του παράγοντα ομοιόστασης της ενέργειας του
μεταβολικού συνδρόμου στον ελληνικό πληθυσμό”**

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά τη διάρκεια των μηνών Σεπτεμβρίου του 2009 έως Ιανουαρίου του 2010.

Επιβλέπων ήταν ο Καθηγητής του Τμήματος κ. Ζήσης Μαμούρης

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής. Ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη που με εμπιστεύτηκε αναθέτοντάς μου ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον ερευνητικό έργο. Τη Λέκτορα κα. Θεολογία Σαραφίδου για την υπομονή που έδειξε απέναντί μου και για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε όποτε τη χρειαζόμουν. Το διδάσκοντα Π.Δ. 407/80 κ. Ιωάννη Βασιλόπουλο για τη συνεισφορά του στην ολοκλήρωσή της, όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας και τους υποψήφιους Διδάκτορες, Κώστα Σταμάτη και Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη, τον Μεταπτυχιακό φοιτητή Θεμιστοκλή Γιαννούλη και όλους τους συμφοιτητές που συνάντησα και μοιραστήκαμε μαζί τις ανησυχίες και τους προβληματισμούς μας κατά τη διάρκεια της . Τους ευχαριστώ όλους θερμά για την πολύτιμη βοήθεια και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή απαρτίζεται από τους:

κ. Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

κα. Αικατερίνη Μούτου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

κα. Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας - Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
Περίληψη	6
1.1. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	7
1.1.1. Εισαγωγή	8
1.1.2. Ορισμοί	9
1.1.3. Κλινικά χαρακτηριστικά	11
1.1.4. Διάγνωση	12
1.1.5. Επιπολασμός	12
1.1.6. Παθοφυσιολογία του Μεταβολικού Συνδρόμου	14
1.1.6.1. Κεντρικά χαρακτηριστικά	14
1.1.6.2. Αντίσταση στην Ινσουλίνη	15
1.1.6.3. Ενδοσπλαχνική Παχυσαρκία	18
1.1.6.4. Αθηρογόνος δυσλιπιδαιμία	18
1.1.6.5. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία	19
1.1.7. Επιπτώσεις	21
1.1.7.1 Μεταβολικό Σύνδρομο και καρδιαγγειακός κίνδυνος	21
1.1.7.2. CRP και Μεταβολικό Σύνδρομο	23
1.1.7.3. Λιπώδης ιστός – αντιποκίνες και CRP. Σύνδεση με το Μεταβολικό Σύνδρομο	24
1.2. ApoA-V	26
1.2.1. Γενικά	27
1.2.2. Απολιποπρωτεΐνες	27
1.2.3. ApoA-V	28
1.2.4. Δομή και σύνθεση	28
1.2.5. Λειτουργίες	29
1.2.5.1. Η ApoA-V ως ενεργοποιητής της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων	29
1.2.5.2. Η ApoA-V και η ενδοκυτταρική της δράση	31
1.2.6. Το γονίδιο της ApoA-V	32
1.2.7. Πολυμορφισμοί (SNPs)	32
1.2.8. Απλότυποι	33
1.2.9 Ο πολυμορφισμός -1131T>C	35

2.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	36
2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.2.1. Υλικά	38
2.2.2. Μέθοδοι	39
2.2.2.1. Πληθυσμός και Δείγμα μελέτης	39
2.2.2.2. Ανθρωπομετρία	39
2.2.2.3. Εργαστηριακές αναλύσεις	40
2.2.2.4. Πίεση αίματος	40
2.2.3. Απομόνωση DNA	41
2.2.3.1. Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του DNA	42
2.2.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	42
2.2.3.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης	47
2.2.3.4. Προετοιμασία πηκτώματος αгарόζης	47
2.2.3.5. Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση	48
2.2.3.6. Ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος	48
2.2.3.7. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	48
2.2.3.8. Πένψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	49
2.2.3.9. Προετοιμασία πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 8%	51
2.2.3.10. Ηλεκτροφόρηση	53
2.2.3.11. Χρώση με Νιτρικό Άργυρο	54
ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	55
2.2.3.12. Στατιστική Ανάλυση	56
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
2.3.1. Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα	58
2.3.2. Αποτελέσματα ανάλυσης γενωμικού DNA	59
2.3.3. Αποτελέσματα για το γονίδιο ApoA-V	61
2.3.4. Αποτελέσματα συσχέτισης του πολυμορφισμού T-1131C με το Μεταβολικό Σύνδρομο	62
2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

Περίληψη

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση του πολυμορφισμού -1131T>C του γονιδίου ApoA-V στη γενετική προδιάθεση υπέρβαρων και παχύσαρκων ατόμων, σχετικά με την εμφάνιση Μεταβολικού Συνδρόμου που συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών επιπλοκών. Ο πολυμορφισμός που μελετήθηκε σε άτομα υπέρβαρα και παχύσαρκα του ελληνικού πληθυσμού ήταν ο -1131T>C. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε εάν αυτός ο πολυμορφισμός αυξάνει τον κίνδυνο για Μεταβολικό Σύνδρομο που σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιαγγειακές βλάβες.

Εφαρμόζοντας την τεχνική PCR-RFLP σε ένα σύνολο 51 δειγμάτων παχύσαρκων και υπέρβαρων ατόμων από την Κεντρική και Νότια Ελλάδα, εκ των οποίων 20 κατηγοριοποιήθηκαν ως Μεταβολικό σύνδρομο σύμφωνα με τα κριτήρια της αναθεωρημένης έκδοσης του NCEP ATP III, εξετάστηκε η συμβολή του πολυμορφισμού ApoA-V -1131T>C στην γενετική προδιάθεση των παχύσαρκων ατόμων να εμφανίσουν Μεταβολικό Σύνδρομο.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, διαπιστώνεται με επιφύλαξη λόγω του μικρού πληθυσμού της μελέτης μας, ότι η συχνότητα του σπάνιου αλληλόμορφου -1131C αυξάνεται σημαντικά στην ομάδα ατόμων με μεταβολικό σύνδρομο (0.30) σε σχέση με τα άτομα ελέγχου (0.17), προσφέροντας ένα ρίσκο 3.514 (CI: 1.065-11.585; $p=0.035$), για την εκδήλωση του συνδρόμου σε άτομα φορείς του συγκεκριμένου αλληλόμορφου. Το παρών αποτέλεσμα ενισχύει την υπόθεση σχετικά με τον ρόλο των απολιποπρωτεϊνών και συγκεκριμένα της ApoA-V στη διαταραχή της μεταβολικής ομοιόστασης της ενέργειας του οργανισμού και την συμμετοχή του παράγοντα αυτού στον παθογενετικό μηχανισμό ανάπτυξης του Μεταβολικού Συνδρόμου στον ελληνικό πληθυσμό.

1.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

1.1.1. Εισαγωγή

Το Μεταβολικό Σύνδρομο (ΜΣ) ή “ Σύνδρομο X ” συνίσταται από μια ομάδα μεταβολικών διαταραχών όπως η υπεργλυκαιμία, η δυσλιπιδαιμία, η αρτηριακή υπέρταση και η κεντρικού τύπου παχυσαρκία που πιθανά συνδέονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη, και σχετίζεται με αυξημένο μακροπρόθεσμο κίνδυνο καρδιαγγειακών επιπλοκών και διαβήτη τύπου 2, τα οποία αποτελούν μείζονα αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στο σύγχρονο κόσμο.

Το Μεταβολικό Σύνδρομο επηρεάζει το ένα τέταρτο με το ένα τρίτο των ενηλίκων και αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της παχυσαρκίας και την γήρανση του πληθυσμού.

Η αξιολόγηση του Μεταβολικού Συνδρόμου έχει αποτελέσει αιτία διαμάχης μεταξύ των επιστημόνων πολλές φορές και οπωσδήποτε είναι απαραίτητη η θέσπιση κριτηρίων για τη διάγνωσή του. Πρώτη φορά οι Reaven και οι συνεργάτες του το 1988, περιέγραψαν το Μεταβολικό Σύνδρομο ως ένα σύμπλεγμα παχυσαρκίας και αντίστασης στην ινσουλίνη, υπεργλυκαιμίας ή διαβήτη τύπου 2, αρτηριακής υπέρτασης, δυσλιπιδαιμίας και άλλων μεταβολικών διαταραχών σε ενήλικες¹.

Ορισμοί αξιολόγησης του Μεταβολικού Συνδρόμου έχουν προταθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), από την Εθνική Οργάνωση Επιμόρφωσης για τη Χοληστερόλη (NCEP) και από την Παγκόσμια Οργάνωση Διαβήτη (IDF).

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του Μεταβολικού Συνδρόμου στοχεύει στη βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη μέσω αλλαγών στον τρόπο ζωής του ατόμου, που συνιστά την απώλεια βάρους και την αύξηση της φυσικής δραστηριότητας του. Σε ασθενείς με αυξημένη γλυκόζη, δυσλιπιδαιμία ή υπέρταση, η αντιμετώπιση έστω και μιας από αυτές τις παραμέτρους που συνιστούν το Μεταβολικό Σύνδρομο, θα μπορούσε να μειώσει κατά πολύ μακροπρόθεσμα τον κίνδυνο των καρδιαγγειακών επιπλοκών και του διαβήτη.

1.1.2. Ορισμοί

Η Εθνική Οργάνωση Επιμόρφωσης για τη χοληστερόλη (National Cholesterol Education Panel – NCEP) και η αναθεωρημένη έκδοσή της^{2,3}, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization - WHO)⁴, η Ευρωπαϊκή Ομάδα για τη Μελέτη της Ινσουλινοαντίστασης (European Group for the Study of Insulin Resistance – EGIR)⁵ και η Παγκόσμια Οργάνωση Διαβήτη (International Diabetes Federation – IDF)^{6,7} έχουν θεσπίσει κριτήρια για τη διάγνωση του Μεταβολικού Συνδρόμου (πίνακας 1.)

Πίνακας 1. Κριτήρια του Μεταβολικού Συνδρόμου

	NCEP ATP III (2005)	WHO (1998)	EGIR (1999)	IDF (2005)
Απαραίτητα	Τίποτα	Αντίσταση στην Ινσουλίνη (IGT, IFG, T2D ή IR)*	Υπερινσουλιναϊμία [±] (Ινσουλίνη πλάσματος > 75 εκατοστιαία θέση)	Κεντρική Παχυσαρκία (WC [§]): ≥94cm (Α), ≥80 cm (Γ)
Κριτήρια	Τρία από τα πέντε κριτήρια που ακολουθούν	Αντίσταση στην Ινσουλίνη ή Διαβήτη και δύο από τα πέντε κριτήρια που ακολουθούν	Υπερινσουλιναϊμία και δύο από τα τέσσερα κριτήρια που ακολουθούν	Παχυσαρκία και δύο από τα τέσσερα κριτήρια που ακολουθούν
Παχυσαρκία	Περιφέρεια μέσης: > 102 cm (Α), > 88 cm (Γ)	Waist/hip ratio: >0.90 (Α), >0.85 (Γ) ή BMI>30 Kg/m ²	Περιφέρεια μέσης: ≥94 cm (Α), ≥ 80 cm (Γ)	Κεντρική παχυσαρκία
Υπεργλυκαιμία	Γλυκόζη νηστείας ≥ 100 mg/dl ή Φ.Α.	Αντίσταση στην Ινσουλίνη	Αντίσταση στην Ινσουλίνη	Γλυκόζη νηστείας ≥100 mg/dl
Δυσλιπιδαιμία	TG≥150 mg/dl ή Φ.Α.	TG≥150 mg/dl ή HDL-C: <35 mg/dl (Α), <39 mg/dl (Γ)	TG≥177 mg/dl ή HDL-C < 39 mg/dl	TG≥150 mg/dl ή Φ.Α.
Δυσλιπιδαιμία	HDL χοληστερόλη: < 40 mg/dl (Α) < 50 mg/dl (Γ) ή Φ.Α.			HDL χοληστερόλη: <40 mg/dl (Α), <50 mg/dl (Γ) ή Φ.Α.
Υπέρταση	>130 mmHg συστολική ή >85 mmHg διαστολική ή Φ.Α.	≥ 140/90 mmHg	≥140/90 mmHg ή Φ.Α.	>130 mmHg συστολική ή >85 mmHg διαστολική ή Φ.Α.
Άλλα κριτήρια		Μικρολευκωματουρία [†]		

* IGT, μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, IFG, μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη νηστείας, T2D, Διαβήτης τύπου 2, IR, αντίσταση στην Ινσουλίνη,

[†] Απέκκριση λευκωματίνης από τα ούρα ≥20 µg/min

[±] Ασθενείς χωρίς Διαβήτη τύπου 2

[§] Τα κριτήρια που θεσπίζονται για την κεντρικού τύπου παχυσαρκία είναι διαφορετικά για την κάθε εθνότητα. Οι τιμές που δίνονται εδώ είναι για Ευρωπαίους

Φ.Α., Φαρμακευτική Αγωγή, Waist/hip ratio: Αναλογία περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίων

Τα κριτήρια του NCEP^{2,3} ορίζουν την ύπαρξη Μεταβολικού Συνδρόμου με την παρουσία τουλάχιστον τριών από τα ακόλουθα πέντε κριτήρια:

1. Κεντρική παχυσαρκία (περιφέρεια μέσης > 102 εκατοστά για τους άνδρες ή > 88 εκατοστά για τις γυναίκες)
2. Γλυκόζη νηστείας (>100 mg/dl)
3. Αυξημένα τριγλυκερίδια ορού (≥ 150 mg/dl)
4. Χαμηλές συγκεντρώσεις HDL πλάσματος (<40 mg/dl για τους άνδρες, <50 mg/dl για τις γυναίκες)
5. Αρτηριακή υπέρταση ($\geq 130/85$ mm Hg)

Ο ορισμός του WHO⁴ για το Μεταβολικό Σύνδρομο περιλαμβάνει ως κριτήριο την αντίσταση στην Ινσουλίνη ή Διαβήτη και 2 από τους ακόλουθους παράγοντες κινδύνου:

1. Κεντρική παχυσαρκία ή Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) > 30
2. Αυξημένα τριγλυκερίδια πλάσματος ≥ 150 mg/dl ή χαμηλή HDL χοληστερόλη
3. Αυξημένη αρτηριακή πίεση ($\geq 140/90$ mmHg)
4. Μικρολευκωματουρία

Η Ευρωπαϊκή Ομάδα για τη Μελέτη της Ινσουλινοαντίστασης (European Group for the Study of Insulin Resistance – EGIR)⁵ θέτει την Υπερινσουλιναμία ως βασικό κριτήριο και δύο από τα τέσσερα κριτήρια που ακολουθούν:

1. Κεντρική παχυσαρκία
2. Αντίσταση στην ινσουλίνη
3. Αυξημένα τριγλυκερίδια ≥ 177 mg/dl ή χαμηλή HDL χοληστερόλη
4. Αρτηριακή Υπέρταση ($\geq 140/90$ mmHg)

Ο IDF έχει επίσης προτείνει κριτήρια για τη διάγνωση του Μεταβολικού Συνδρόμου^{6,7}. Ο ορισμός του IDF διαφέρει από αυτόν του NCEP σε δύο σημεία: (α) η περιφέρεια της μέσης είναι απαραίτητο στοιχείο του Μεταβολικού Συνδρόμου, με βάση τον ορισμό του IDF, και β) το όριο για την περιφέρεια της μέσης έχει μειωθεί από το 102 στα 94 εκατοστά για τους άνδρες και από τα 88 στα 80 εκατοστά για τις γυναίκες δίνοντας έμφαση στη σημασία της κεντρικής παχυσαρκίας⁸. Βέβαια, τα κριτήρια του IDF αναγνωρίζουν μεν ένα μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού που βρίσκεται σε καρδιαγγειακό κίνδυνο, η εισαγωγή όμως της περιφέρειας μέσης > 94 εκατοστά ως απαραίτητου στοιχείου για τη διάγνωση του Μεταβολικού Συνδρόμου, αποτυγχάνει να αναγνωρίσει έναν αριθμό ατόμων με περιφέρεια μέσης < 94 εκατοστά που βρίσκονται σε υψηλό μεταβολικό κίνδυνο. Επίσης, αν και η κεντρική

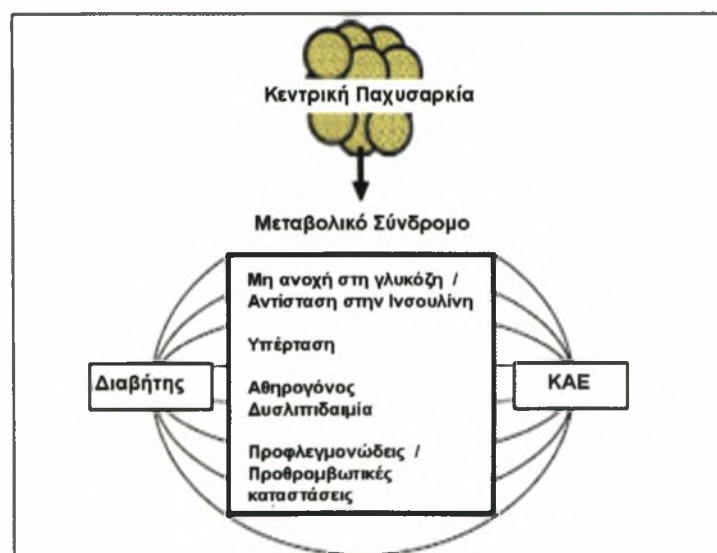
παχυσαρκία αναγνωρίζεται σαν απαραίτητος παράγοντας για τη διάγνωση του Μεταβολικού Συνδρόμου σύμφωνα με τα κριτήρια του IDF, ωστόσο έχει δεχθεί επικρίσεις για την έμφαση που δίνεται στο θέμα της παχυσαρκίας και όχι στην αντίσταση στην ινσουλίνη, που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της νόσου⁷.

Ο ορισμός του Μεταβολικού Συνδρόμου τίθεται ομοίως και στα παιδιά και του εφήβους 2-19 χρόνων αν παρουσιάζουν τρία από τα ακόλουθα κριτήρια^{9,10}:

1. ΔΜΣ>95^η εκατοστιαία θέση ή πάνω από την καμπύλη που αντιστοιχεί στο ΔΜΣ 30 των ενηλίκων.
2. Επίπεδα τριγλυκεριδίων >95^η εκατοστιαία θέση
3. Επίπεδα HDL<5^η εκατοστιαία θέση
4. Συστολική ή διαστολική πίεση αίματος > 95^η εκατοστιαία θέση ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και την εθνικότητα
6. Μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, η οποία ορίζεται ως επίπεδο γλυκόζης >140 mg/dl αλλά <200 mg/dl μετά από δύο ώρες φόρτιση με γλυκόζη από το στόμα.

1.1.3. Κλινικά χαρακτηριστικά

Εκτός από την υπεργλυκαιμία, την δυσλιπιδαιμία και την υπέρταση, όπως προτάθηκε από τον Reaven¹, η κεντρική παχυσαρκία και διάφορες προφλεγμονώδεις και προθρομβωτικές καταστάσεις έχουν συμπεριληφθεί στα βασικά χαρακτηριστικά του Μεταβολικού Συνδρόμου όπως είναι η αυξημένη συγκέντρωση στο πλάσμα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), του ανασταλτικού παράγοντα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου και του ινωδογόνου (Εικόνα 1.)¹¹.



Εικόνα 1. Το Μεταβολικό Σύνδρομο. Η κεντρική παχυσαρκία είναι η κύρια ανωμαλία που προδιαθέτει στην ανάπτυξη Μεταβολικού Συνδρόμου, το οποίο περιλαμβάνει επίσης την αντίσταση στην ινσουλίνη (υπεργλυκαιμία ή διαβήτης τύπου 2), την αθηρογόνο δυσλιπιδαιμία που χαρακτηρίζεται από υπερτριγλυκεριδαιμία και μειωμένη HDL, την υπέρταση μαζί με προφλεγμονώδεις και προθρομβωτικές καταστάσεις (αυξημένη συγκέντρωση στο πλάσμα του ανασταλτικού παράγοντα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου, του ινωδογόνου και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP). ΚΑΕ. Καρδιαγγειακές επιπλοκές.

Σίγουρα δεν θα εμφανίσουν όλοι οι ασθενείς όλα τα χαρακτηριστικά του Μεταβολικού Συνδρόμου, αλλά η πλειοψηφία των ενηλίκων θα έχει ένα ή περισσότερα από αυτά. Υπάρχουν όμως και άλλες παθολογικές καταστάσεις που μπορούν να συνδεθούν με το Μεταβολικό Σύνδρομο όπως το μη αλκοολικό λιπώδες ήπαρ, η υπνική άπνοια, η μελανίζουσα ακάνθωση, και στις γυναίκες το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών³.

1.1.4. Διάγνωση

Προς το παρόν, το Μεταβολικό Σύνδρομο δεν μπορεί να διαγνωσθεί με μια απλή εξέταση. Διάφορα κριτήρια έχουν προταθεί, βασισμένα σε πολλούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου, για την ταυτοποίηση του Μεταβολικού Συνδρόμου (Πίνακας 1)^{2-7,9}. Τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα κριτήρια είναι αυτά που έχουν θεσπιστεί από την NCEP ATP III^{2,3,8}. Η διάγνωση του απαιτεί τρία ή περισσότερα από τα πέντε προτεινόμενα κριτήρια (Πίνακας 1).

Η ταυτοποίηση του Μεταβολικού Συνδρόμου από τον WHO, σε αντίθεση με τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί από την NCEP ATP III, προσανατολίζεται στην αντίσταση στην Ινσουλίνη ή στη μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη (IGT) σαν απαραίτητη προϋπόθεση, μαζί με δύο από τα ακόλουθα κριτήρια: παχυσαρκία, υπερτριγλυκεριδαιμία, χαμηλή HDL χοληστερόλη, υπέρταση ή μικρολευκωματουρία (Πίνακας 1)⁴.

1.1.5. Επιπολασμός

Ανεξαρτήτως ορισμού που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του Μεταβολικού Συνδρόμου, μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι ο επιπολασμός του είναι περίπου ο ίδιος στον δεδομένο πληθυσμό. Στη μελέτη

NHANES 1999-2002 (National Health and Nutrition Examination Survey) εκτιμήθηκε ότι ο επιπολασμός του στις ΗΠΑ σε ενήλικες 20 ετών και πάνω, ήταν μεταξύ 34,6% (σύμφωνα με τα κριτήρια του NCEP) και 39,1% (σύμφωνα με τα κριτήρια του IDF)^{12,13}. Είναι πλέον γεγονός ότι το Μεταβολικό Σύνδρομο τείνει να γίνει παγκόσμια επιδημία. Από το σύνδρομο πάσχουν 47 εκατομμύρια Αμερικανοί οι οποίοι είναι συνήθως μέσης ηλικίας. Το ετήσιο κόστος για τη θεραπεία του Μεταβολικού Συνδρόμου αγγίζει τα 4000\$ ανά άτομο στις ΗΠΑ.

Ο επιπολασμός του Μεταβολικού Συνδρόμου αυξάνεται με την ηλικία, επηρεάζοντας τους μισούς των ενηλίκων πάνω από την ηλικία των 60 ετών¹². Είναι περίπου ο ίδιος στους άνδρες όταν χρησιμοποιούνται τα κριτήρια του WHO και του IDF και διαφέρει λιγάκι μεταξύ των φύλων όταν χρησιμοποιούνται τα κριτήρια του NCEP^{12,14}. Η εθνικότητα, επίσης, επηρεάζει τον επιπολασμό του¹².

Αυξάνεται, επίσης, παράλληλα με τη γήρανση του πληθυσμού και την “επιδημία” της παχυσαρκίας¹⁵. Είναι παρών σε λιγότερο από το 6% των ενηλίκων με φυσιολογικό βάρος, αλλά αυξάνεται ραγδαία στα υπέρβαρα και στα παχύσαρκα άτομα (22% και 60% αντίστοιχα). Ο επιπολασμός του, αυξάνεται κατακόρυφα ταυτόχρονα με την αύξηση της παχυσαρκίας, σε άνδρες και γυναίκες με BMI 35 Kg/m² ή μεγαλύτερο¹⁶. Η αύξηση της παιδικής παχυσαρκίας επιτείνει το πρόβλημα και θα αποτελέσει μια πρόκληση για το μέλλον. Το 9.5% των εφήβων στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι έχει Μεταβολικό Σύνδρομο (σύμφωνα με τα κριτήρια του IDF)¹⁷.

Στη μελέτη DECODE εκτιμήθηκε ότι ο επιπολασμός του στην Ευρώπη ήταν 15,7% στους άνδρες και 14,2% στις γυναίκες¹⁸. Στην Ελλάδα, στη μελέτη ATTICA, σε τυχαίο δείγμα 3042 κατοίκων της περιοχής του λεκανοπεδίου, φαίνεται ότι το 25% των ανδρών και το 15% των γυναικών πάσχουν από αυτό το σύνδρομο. Αν μάλιστα υιοθετηθούν, οι πιο πρόσφατες οδηγίες για τον προσδιορισμό του συνδρόμου που δόθηκαν στη δημοσιότητα από την Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία, η συχνότητα του Μεταβολικού Συνδρόμου φτάνει στο 53% στους άνδρες και το 45% στις γυναίκες, το 78% και 74% των οποίων αντίστοιχα, δεν γνωρίζουν την κατάστασή τους¹⁹. Πιο πρόσφατα σε δείγμα πληθυσμού της Βόρειας Ελλάδας, με τη χρήση των κριτηρίων του NCEP ATP III καταγράφηκε επιπολασμός της τάξεως του 25% ενώ με τα κριτήρια του IDF το ποσοστό αυξανόταν στο 43%²⁰.

Δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται διαφορετικά κριτήρια κάθε φορά που γίνεται μια μελέτη, είναι δύσκολο να συγκριθεί ο επιπολασμός και η επίπτωση του

Μεταβολικού Συνδρόμου μεταξύ των πληθυσμών. Πληροφορίες για τον επιπολασμό του μεταξύ διαφορετικών χωρών δίνονται στον Πίνακα 2²¹.

Πίνακας 2.

Επιπολασμός του Μεταβολικού Συνδρόμου σύμφωνα με τα κριτήρια του NCEP

Ηλικία	Χώρα	Άνδρες%	Γυναίκες%
>20	ΗΠΑ	24.0	23.7
>18	Ελλάδα	24.2	22.8
20-80	Κύπρος	26.5	18.3
>20	Ιταλία	22.3	27.2
>20	Ινδία	22.9	39.9
>20	Ιράν	24.0	42.0
>25	Πολωνία	16.2	20.9
>25	Β. Ιορδανία	28.7	40.9
35-74	Κίνα	9.8	17.8
55-74	Γερμανία	28.0	24.0
50-69	Ιρλανδία	21.8	21.5
70	Σουηδία	26.3	19.2

Διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο, τις διαιτητικές συνήθειες, τη φυσική δραστηριότητα, την ηλικία, το φύλο, το επίπεδο σίτισης ενός πληθυσμού μπορεί να επηρεάζουν τον επιπολασμό του Μεταβολικού Συνδρόμου και των χαρακτηριστικών του. Ωστόσο, όλες οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι ο επιπολασμός του Συνδρόμου είναι υψηλός παγκοσμίως. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αύξηση της παχυσαρκίας και στον καθιστικό τρόπο ζωής κάνοντας επιτακτική την ανάγκη για θεραπευτικές παρεμβάσεις.

1.1.6. Παθοφυσιολογία του Μεταβολικού Συνδρόμου

1.1.6.1 Κεντρικά χαρακτηριστικά

Τέσσερα είναι τα κεντρικά χαρακτηριστικά του Μεταβολικού Συνδρόμου: αντίσταση στην Ινσουλίνη, ενδοσπλαχνική παχυσαρκία, αθηρογόνος δυσλιπιδαιμία και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Από αυτά, τα δύο πρώτα συνδέονται απόλυτα με το Μεταβολικό Σύνδρομο, και επειδή η απώλεια βάρους μπορεί να βελτιώσει τα υπόλοιπα κεντρικά χαρακτηριστικά του, έτσι και η παχυσαρκία κάποιου βαθμού είναι απαραίτητη για την εμφάνιση του Συνδρόμου. Αντιστρόφως, υπάρχουν ασθενείς παχύσαρκοι, οι οποίοι δεν εκδηλώνουν κανένα από τα χαρακτηριστικά του, οπότε απαιτείται και η προδιάθεση για αντίσταση στην Ινσουλίνη και η ύπαρξη παχυσαρκίας για την εκδήλωση του φαινότυπου του Μεταβολικού Συνδρόμου. Η

αθηρογόνος δυσλιπιδαιμία είναι απόρροια της αντίστασης στην Ινσουλίνη και της ενδοσπλαχνικής παχυσαρκίας, και μπορεί να συμπεριληφθεί στα κεντρικά χαρακτηριστικά του Συνδρόμου με απαραίτητα διαφορετικά κριτήρια τα αυξημένα τριγλυκερίδια του πλάσματος και τη χαμηλή HDL χοληστερόλη. Επίσης, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία οφείλεται στην αντίσταση στην Ινσουλίνη, στις αντιποκίνες και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs) που απελευθερώνονται από τον λιπώδη ιστό. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία συνοδεύεται από αρτηριακή υπέρταση. Η αθηρογόνος δυσλιπιδαιμία και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία συνεισφέρουν στη ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και καρδιαγγειακών επιπλοκών.

Έτσι λοιπόν, τα τέσσερα αυτά κεντρικά χαρακτηριστικά – αντίσταση στην Ινσουλίνη, ενδοσπλαχνική παχυσαρκία, αθηρογόνος δυσλιπιδαιμία και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία - συμπεριλαμβάνονται στον αναλυτικό ορισμό του Μεταβολικού Συνδρόμου, απλοποιώντας την καθημερινή χρήση του στην κλινική πράξη. Ακόμα κι αν, ευρήματα όπως η συστηματική φλεγμονή, η υπερπηκτικότητα ή η μικρολευκωματουρία είναι σημαντικά στην παθοφυσιολογία του, δεν ανήκουν στα κεντρικά χαρακτηριστικά του, γιατί δεν είναι ανεξάρτητα⁸.

1.1.6.2 Αντίσταση στην Ινσουλίνη

Η Ινσουλίνη παράγεται από το πάγκρεας σε απάντηση στην υπεργλυκαιμία και διεγείρει τη χρησιμοποίηση της γλυκόζης από διάφορους ιστούς. Οι ιστοί που απορροφούν τη γλυκόζη από την κυκλοφορία και τη χρησιμοποιούν περισσότερο, είναι οι σκελετικοί μύες, το συκώτι και ο λιπώδης ιστός. Στους σκελετικούς μύες και στο λιπώδη ιστό, η ινσουλίνη διεγείρει την πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα μέσω του μεταφορέα GLUT4. Στους σκελετικούς μύες και στο συκώτι, η ινσουλίνη διεγείρει την σύνθεση του γλυκογόνου και αναστέλλει τη γλυκογονόλυση. Στο συκώτι επίσης, η ινσουλίνη μειώνει την ηπατική γλυκονεογένεση. Στο λιπώδη ιστό, αναστέλλει την εξάντληση των αποθεμάτων λίπους ή τη λιπόλυση και διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης. Το αποτέλεσμα όλων αυτών των βιοχημικών διεργασιών είναι η αύξηση της πρόσληψης της γλυκόζης, η μείωση των επιπέδων της στην κυκλοφορία και η μετατροπή της σε αποθήκες γλυκογόνου ή λίπους²². Στην αντίσταση στην Ινσουλίνη, λιπώδη, μυϊκά και ηπατικά κύτταρα δεν απαντούν κατάλληλα σ' αυτή και οι τιμές της γλυκόζης που βρίσκεται στην κυκλοφορία παραμένουν υψηλές, μια κατάσταση που θεωρείται παθολογική. Αυτή επιδεινώνεται με την απορύθμιση διάφορων ανατροφοδοτικών μηχανισμών.

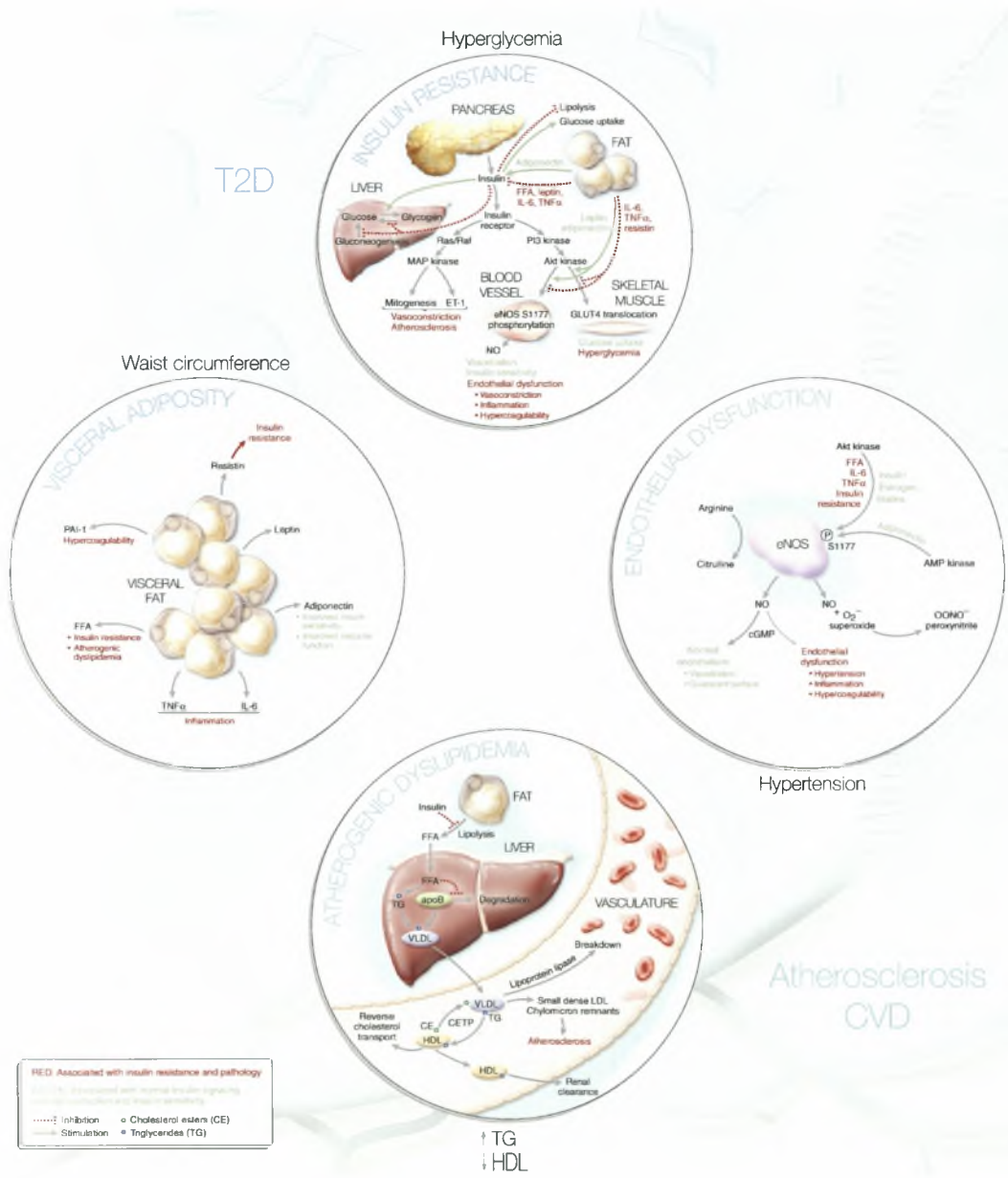
Τα επίπεδα της Ινσουλίνης, που διεγείρει την απορρόφηση της γλυκόζης, μπορούν να φθάσουν μέχρι και πάνω από έξι φορές. Κάποιες από αυτές τις διακυμάνσεις μπορεί να οφείλονται στην παχυσαρκία και κάποιες σε γενετικούς παράγοντες. Αντίσταση στην Ινσουλίνη υπάρχει όταν μειώνεται η απόκριση των περιφερειακών ιστών (σκελετικοί μύες, λίπος και συκώτι) σ' αυτή. Η αντίσταση στην Ινσουλίνη είναι ένα ισχυρό προγνωστικό εργαλείο για Διαβήτη τύπου 2, ενώ η υπερινσουλιναιμία είναι ένας δείκτης αντίστασης στην Ινσουλίνη.

Φυσιολογικά η Ινσουλίνη συνδέεται με τον υποδοχέα της, την κινάση της τυροσίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων της τυροσίνης και την ενεργοποίηση δύο παράλληλων οδών: την οδό της κινάσης της φωσφοϊνοσιτιδής-3 (PI3K) και την οδό της μιτογενούς πρωτεϊνικής κινάσης (MAP). Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης ενεργοποιεί την PI3K που με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση 1 της φωσφοϊνοσιτιδής-3 (PDK1) της κινάσης και την Akt κινάση. Η οδός της PI3K-Akt κινάσης θεωρείται υπεύθυνη για πολλά από τα μεταβολικά αποτελέσματα της Ινσουλίνης. Στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, η Akt κινάση φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ενδοθηλιακή συνθάση του οξειδίου του αζώτου (eNOS). Στους σκελετικούς μύες και στο λιπώδη ιστό, η Akt κινάση διεγείρει τον μεταφορέα της επιφάνειας του κυττάρου GLUT4, και οδηγεί στην αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης.

Παράλληλα, η φωσφορυλίωση της τυροσίνης από την Shc πρωτεΐνη ενεργοποιεί την αντικατάσταση του παράγοντα Sos της GTP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της MAP κινάσης συμπεριλαμβανομένου της Ras, της Raf, της κινάσης MAP της κινάσης (MEK) και της εξωκυτταρικής κινάσης (ERK). Η οδός της MAP κινάσης μεσολαβεί στην παραγωγή του πεπτιδίου της ενδοθηλίνης-1 (ET-1), οδηγώντας σε αγγειοσυστολή. Η έκφραση των μορίων VCAM-1 και E-σελεστίνης, δημιουργεί περισσότερες λευκοκυτταρικές – ενδοθηλιακές αλληλεπιδράσεις. Η αύξηση και η μιτογένεση επηρεάζουν τα λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα.

Στην Ινσουλinoαντίσταση, η οδός της PI3K – Akt επηρεάζεται, ενώ η οδός της MAP κινάσης όχι. Αυτό επηρεάζει την ισορροπία μεταξύ τους. Αναστολή της οδού της PI3K – Akt μειώνει την παραγωγή του οξειδίου του αζώτου (NO), με αποτέλεσμα την δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, ενώ μειωμένη μεταφορά μέσω GLUT4 οδηγεί στη μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από τους σκελετικούς μύες και το λιπώδη ιστό. Αντίθετα, η οδός της MAP κινάσης δεν επηρεάζεται, υπάρχει

συνεχόμενη παραγωγή του πεπτιδίου της ενδοθηλίνης-1 (ET-1), έκφραση των αγγειακών κυττάρων και μιτογένεση που επηρεάζουν τα λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο, η αντίσταση στην ινσουλίνη οδηγεί σε αγγειακές ανωμαλίες που προδιαθέτουν σε αθηροσκλήρωση (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Παθοφυσιολογία του Μεταβολικού Συνδρόμου

Η Ινσουλίνη αυξάνει την ροή του αίματος στους ιστούς μέσω ενεργοποίησης της eNOS, οδηγώντας σε δύο αποτελέσματα^{22,23}. Οι ανταλλαγές των τριχοειδών γίνονται μέσα σε ελάχιστα λεπτά ενώ η διαστολή αυξάνει την αιμάτωση των

μεγαλύτερων αγγείων σε 30 λεπτά έως 2 ώρες. Αυτά τα δύο συνεισφέρουν στην αγγειοδιαστολή και αυξάνουν την αποστολή γλυκόζης και Ινσουλίνης στους ιστούς. Η ομοιόσταση Ινσουλίνης – γλυκόζης στους ιστούς συνεισφέρει στο μεταβολισμό της γλυκόζης και στη φυσιολογική συγκέντρωση Ινσουλίνης. Εάν ανασταλεί φαρμακευτικά η παραγωγή του NO, η διάθεση της γλυκόζης μειώνεται κατά 40%.

Έτσι, η σηματοδότηση της Ινσουλίνης επηρεάζει την περιφερειακή χρήση της γλυκόζης, τον τόνο των αγγείων και την ροή του αίματος. Μηχανισμοί που συνεισφέρουν στην αντίσταση στην Ινσουλίνη μπορούν, ως εκ τούτου, να επηρεάσουν την αγγειακή λειτουργία, να προκαλέσουν υπεργλυκαιμία, να παράγουν προϊόντα μη ενζυμικής γλυκοζιλίωσης, τοξικότητα από τα FFAs, παχυσαρκία, δυσλιπιδαιμία και προφλεγμονώδεις καταστάσεις.

1.1.6.3. Ενδοσπλαχνική παχυσαρκία

Η ενδοσπλαχνική παχυσαρκία μειώνει την πρόσληψη της γλυκόζης και σχετίζεται με την αντίσταση στην Ινσουλίνη. Ο μηχανισμός πιθανώς περιλαμβάνει τις αντιποκίνες που παράγονται στο λιπώδη ιστό και εμπλέκονται στο μεταβολισμό και την αγγειακή λειτουργία²⁴. Επίσης περιλαμβάνει τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF α) και την ιντερλευκίνη-6 (IL-6), που είναι προφλεγμονώδεις και συνεισφέρουν στην αντίσταση στην Ινσουλίνη και στην αγγειακή δυσλειτουργία. Το σύστημα ρενίνης αγγειοτενσίνης, επίσης ενεργοποιείται στο λιπώδη ιστό, οδηγώντας σε υπέρταση και Ινσουλινοαντίσταση. Αντίθετα, η αντιπονεκτίνη είναι μια αντιποκίνη με προστατευτικό ρόλο που αυξάνει την ευαισθησία στην Ινσουλίνη. Τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης μειώνονται στην παχυσαρκία, στον Διαβήτη τύπου 2 και στο Μεταβολικό Σύνδρομο. Επιπρόσθετα με τις αντιποκίνες, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs) που ελευθερώνονται από το λιπώδη ιστό, και άλλα βιοδραστικά λιπίδια, δρουν μαζί καταστρέφοντας την οδό της PI3K – Akt και αυξάνουν το οξειδωτικό στρες (Εικόνα 2).

1.1.6.4. Αθηρογόνος δυσλιπιδαιμία

Βασικό χαρακτηριστικό της αθηρογόνου δυσλιπιδαιμίας, είναι τα υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων πλάσματος, η χαμηλή HDL χοληστερόλη και η αυξημένη LDL. Η Ινσουλινοαντίσταση και η ενδοσπλαχνική παχυσαρκία σχετίζονται με την αθηρογόνο δυσλιπιδαιμία²⁵.

Η αντίσταση στην Ινσουλίνη οδηγεί σε αθηρογόνο δυσλιπιδαιμία με πολλούς τρόπους. Πρώτον, η Ινσουλίνη φυσιολογικά εμποδίζει την λιπόλυση στα λιποκύτταρα, έτσι η διαταραγμένη σηματοδότηση της Ινσουλίνης αυξάνει τη λιπόλυση, με αποτέλεσμα την αύξηση των FFAs. Στο συκώτι, τα FFAs χρησιμοποιούνται σαν υπόστρωμα για τη σύνθεση των τριγλυκεριδίων. Τα FFAs συμμετέχουν στην παραγωγή της απολιποπρωτεΐνης ApoB, η οποία είναι ισχυρά συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), με αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερων VLDL. Δεύτερον, η Ινσουλίνη φυσιολογικά αποδομεί την ApoB μέσω της οδού της PI3K, όμως η Ινσουλινοαντίσταση αυξάνει άμεσα την παραγωγή VLDL. Τρίτον, η Ινσουλίνη ρυθμίζει τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης που περιορίζει την ποσότητα των VLDL και μεσολαβεί στην κάθαρση τους.

Αρα, η υπερτριγλυκεριδαιμία στην Ινσουλινοαντίσταση είναι το αποτέλεσμα της αυξημένης παραγωγής VLDL και της μειωμένης κάθαρσής τους. Οι VLDL μεταβολίζονται σε υπολείμματα λιποπρωτεϊνών και μικρής πυκνότητας LDL, που μπορούν να προάγουν το σχηματισμό αθηρώματος. Τα τριγλυκερίδια των VLDL μεταφέρονται στις HDL με την πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP) ανταλλάσσοντας τους εστέρες χοληστερόλης, με αποτέλεσμα οι HDL να εμπλουτίζονται με τριγλυκερίδια και οι VLDL με εστέρες χοληστερόλης. Οι εμπλουτισμένες με τριγλυκερίδια HDL είναι καλύτερο υπόστρωμα για την ηπατική λιπάση, και απομακρύνονται γρήγορα από την κυκλοφορία, αφήνοντας λίγα μόρια HDL να συμμετέχουν στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης στο αγγειακό σύστημα (Εικόνα 2).

1.1.6.5. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι η τελική κοινή οδός μεταξύ πολλών παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου και αθηροσκλήρωσης^{22,26}. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα στην εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων, εξυπηρετούν σημαντικούς μηχανισμούς, καθώς και βιολογικές λειτουργίες. Το ενδοθήλιο ανταποκρίνεται σε φυσιολογικά και παθολογικά ερεθίσματα, και παράγει αγγειοδραστικές ουσίες όπως NO, προστακυκλίνη και ενδοθηλίνες. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα λευκοκύτταρα και μονοκύτταρα επηρεάζοντας τη φλεγμονή, και με τα αιμοπετάλια επηρεάζοντας την αιμόσταση και τη θρόμβωση. Το ενδοθήλιο επίσης, ρυθμίζει την αντίδραση των λείων μυών των αγγείων, η οποία

μπορεί να συμβάλει στη διαμόρφωση της αθηρωματικής πλάκας. Η φυσιολογική λειτουργία του ενδοθηλίου είναι η προστασία από αυτές τις διαδικασίες ενώ η δυσλειτουργία του έχει κεντρική σημασία στην ανάπτυξη αθηρωματικής βλάβης.

Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, με την ευρεία έννοια, έχουμε όταν το ενδοθήλιο αποτυγχάνει να μας παρέχει τους φυσιολογικούς και προστατευτικούς μηχανισμούς του. Αυτό μπορεί να συμβαίνει επειδή το ενδοθήλιο είναι κατεστραμμένο ή λείπει, όπως στην περίπτωση των γυμνών ενδοθηλίων των στεφανιαίων αρτηριών που έχουν υποβληθεί σε αγγειοπλαστική. Μπορεί επίσης να συμβαίνει όταν το ενδοθήλιο πλήττεται για παράδειγμα από το οξειδωτικό στρες, την υπεργλυκαιμία, από προϊόντα μη ενζυμικής γλυκοζιλίωσης, FFAs, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή αντιποκίνες. Ένα κοινό χαρακτηριστικό της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας είναι η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO στο αγγειακό σύστημα.

Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί που περιγράφουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία ²⁶. Ένας από τους πιο σημαντικούς, είναι η μείωση της φωσφορυλίωσης της eNOS από υπόλειμμα σερίνης (Ser 1177)^{27,28} και η άμεση αντίδραση του NO με υπεροξείδιο που σχηματίζει υπεροξυνιτρικό ανιόν²⁹. Επιπλέον, η ασυμμετρική διμεθυλαργινίνη (ADMA) μπορεί να ανταγωνίζεται με την αργινίνη για να μειώσει την παραγωγή του ενδοθηλιακού NO. Η eNOS απαιτεί την παρουσία ενζυμικών συμπαραγόντων, όπως φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD), φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο (FMN), NADPH και τετραϋδροβιοπτερίνη (BH₄). Σε περίπτωση απουσίας της BH₄, η μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω της eNOS μπορεί να είναι 'ασύζευκτη', με αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου από την eNOS. Το υπεροξείδιο, είτε σχηματίζεται από την NADPH οξειδάση ή από ασύζευκτη eNOS, αντιδρά με το NO σε μια εξαιρετικά ταχύτατη περιορισμένης διάδοσης αντίδραση και σχηματίζει υπεροξυνιτρικό ανιόν, το οποίο έχει τοξική δράση.

Η φωσφορυλίωση της eNOS από υπόλειμμα σερίνης (Ser 1177) φαίνεται ότι ρυθμίζει σημαντικά την ενζυμική δράση της. Η φωσφορυλίωση από υπόλειμμα σερίνης (Ser 1177) έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη ροή ηλεκτρονίων μέσω της περιοχής της αναγωγάσης και μειώνει την αποσύνδεση της καλμοδουλίνης. Το αποτέλεσμα είναι η eNOS να γίνεται περισσότερο δραστική και να παράγει περισσότερο NO, ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Η φωσφορυλίωση της eNOS μειώνεται στο διαβήτη, στην υπερχοληστερολαιμία και στην αθηροσκλήρωση. Η φυσιολογική σηματοδότηση της Ινσουλίνης αυξάνει την φωσφορυλίωση της eNOS μέσω της οδού της R13K-Akt. Τα οιστρογόνα, οι στατίνες,

οι ενδοθηλιακοί αγγειακοί αυξητικοί παράγοντες (VEGF) και η λεπτίνη αυξάνουν την φωσφορυλίωση της eNOS από την Akt κινάση. Η Αντιπονεκτίνη, η προστατευτική αντιποκίνη, αυξάνει την φωσφορυλίωση της eNOS από την AMP κινάση. Το γεγονός ότι πολλές κινάσες επηρεάζουν διαφορετικές οδούς σηματοδότησης, που συγκλίνουν για να τροποποιήσουν τη δράση της eNOS με τη φωσφορυλίωση, δείχνει ότι αυτό είναι ένα κοινό σημείο στο οποίο βασίζεται η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου από διάφορες αιτίες. Έτσι, η φωσφορυλίωση της eNOS από υπόλειμμα σερίνης (Ser 1177) παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δράσης της eNOS και σημαντικό στόχο για θεραπευτική παρέμβαση στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία^{26,30} (Εικόνα 2).

Η αντίσταση στην Ινσουλίνη οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία εξαιτίας της μειωμένης δράσης της Akt κινάσης, με αποτέλεσμα τη μειωμένη φωσφορυλίωση και δράση της eNOS. Επειδή η φωσφορυλίωση της eNOS από υπόλειμμα σερίνης (Ser 1177) είναι απαραίτητη για την αιμοδυναμική δράση της Ινσουλίνης, το αποτέλεσμα είναι η μειωμένη ροή αίματος στο σκελετικό μυ, δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο που επιδεινώνει την κατάσταση. Επιπλέον, η έκφραση του πεπτιδίου της ενδοθηλίνης ET-1 και η μιτογένεση του λείου αγγειακού μυ δεν επηρεάζονται από την Ινσουλινοαντίσταση, συνεισφέρουν όμως περισσότερο στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.

Η ενδοσπλαχνική παχυσαρκία προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέσω της δράσης της ρεξιστίνης, της IL-6 και του TNFα στη φωσφορυλίωση της eNOS. Εκτός από την απενεργοποίηση της δράσης του IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1), ο TNFα ενεργοποιεί άμεσα τη NADPH οξειδάση, αυξάνοντας την δημιουργία υπεροξειδίων. Ο TNFα διεγείρει επίσης τη λιπόλυση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση FFA. Αντίθετα, η αντιπονεκτίνη, η οποία διεγείρει τη φωσφορυλίωση της eNOS, μειώνεται στο Μεταβολικό Σύνδρομο. Στην ενδοσπλαχνική παχυσαρκία, η αντίσταση της λεπτίνης αυξάνει επίσης τη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Τα FFAs συνεισφέρουν στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία με ένα συνδυασμό μειωμένης δράσης της PI3K-Akt, αυξημένων ελευθέρων ριζών και αυξημένης παραγωγής του πεπτιδίου της ενδοθηλίνης ET-1.

1.1.7. Επιπτώσεις

1.1.7.1 Μεταβολικό Σύνδρομο και Καρδιαγγειακός Κίνδυνος

Κάθε χαρακτηριστικό του Μεταβολικού Συνδρόμου συνδέεται από μόνο του με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών επιπλοκών. Η παρουσία όμως του

Μεταβολικού Συνδρόμου αυξάνει σημαντικά τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα από καρδιαγγειακές επιπλοκές¹¹. Πολλές πληθυσμιακές και προοπτικές μελέτες συσχετίζουν την παρουσία του με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιαγγειακές ασθένειες. Στη μελέτη NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey), στην οποία συμμετείχαν άτομα ηλικίας 50 ετών και άνω, ο λόγος πιθανοτήτων (OR - Odds Ratio) ήταν 2.07 για καρδιαγγειακές επιπλοκές (14% στα άτομα με Μεταβολικό Σύνδρομο έναντι 9% στα άτομα χωρίς)³¹. Περίπου 85% των ασθενών με διαβήτη είχαν Μεταβολικό Σύνδρομο, ενώ 15% των ασθενών με διαβήτη αλλά χωρίς Μεταβολικό Σύνδρομο είχαν χαμηλότερο επιπολασμό καρδιαγγειακών ασθενειών. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στις χαμηλότερες τιμές των τριγλυκεριδίων, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις HDL χοληστερόλης και στις χαμηλότερες τιμές αρτηριακής πίεσης μεταξύ αυτών των ομάδων με διαβήτη.

Στη μελέτη WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study) προέκυψαν περίπου τα ίδια αποτελέσματα. Ο κίνδυνος για καρδιαγγειακές επιπλοκές αυξανόταν όσο περισσότερα ήταν τα κεντρικά χαρακτηριστικά του Μεταβολικού Συνδρόμου και έφθανε στο 2.75 παρουσία του, ενώ συνοδευόταν από υψηλές συγκεντρώσεις CRP³². Στη μελέτη Framingham, το Μεταβολικό Σύνδρομο εκτιμήθηκε περίπου στο 25% όλων των νεοεμφανιζόμενων περιστατικών καρδιαγγειακών ασθενειών. Ο 10ετής κίνδυνος για καρδιαγγειακές ασθένειες σε άνδρες με Μεταβολικό Σύνδρομο αυξήθηκε από 10% σε 20%, ενώ στις γυναίκες ήταν λιγότερος από 10% εξαιτίας του ότι τα περιστατικά των καρδιαγγειακών επιπλοκών ήταν λιγότερα όταν ήταν νέες³³.

Στη μελέτη Kuopio (Finnish Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study), οι καρδιαγγειακές επιπλοκές και η γενική θνησιμότητα ήταν σημαντικά αυξημένες στους άνδρες με Μεταβολικό Σύνδρομο, ακόμη και σε απουσία πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου και διαβήτη³⁴. Οι άνδρες μέσης ηλικίας με Μεταβολικό Σύνδρομο είχαν 2.9 με 4.2 υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας από καρδιαγγειακές επιπλοκές³⁴.

Μια μελέτη βασισμένη σε 11 Ευρωπαϊκές προοπτικές μελέτες, με τη συμμετοχή 6156 ανδρών και 5356 γυναικών χωρίς διαβήτη, ηλικίας 30 έως 89 ετών, επιβεβαίωσε ότι τα μη διαβητικά άτομα με Μεταβολικό Σύνδρομο διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο θανάτου από διάφορες αιτίες καθώς και από καρδιαγγειακές επιπλοκές¹⁸. Από τους 1119 θανάτους που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια μιας περιόδου παρακολούθησης 8.8 ετών, 432 οφείλονταν σε καρδιαγγειακές ασθένειες.

Η συνολική αναλογία κινδύνου, από όλες τις αιτίες και από καρδιαγγειακή θνησιμότητα στα άτομα με Μεταβολικό Σύνδρομο ήταν ίδια στους άνδρες και στις γυναίκες. Σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου ήταν 1.44 (με 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1.17 με 1.84) και 2.26 (με 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1.61 με 3.17) αντίστοιχα στους άνδρες, ενώ στις γυναίκες ήταν 1.39 (με 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1.02 με 1.87) και 2.78 (με 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1.57 με 4.94) αντίστοιχα¹⁸.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω και από τις προοπτικές μελέτες, το Μεταβολικό Σύνδρομο σχετίζεται με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, και σημαντικά αυξημένο ρίσκο (Πίνακας 3). Ο στόχος πολλών τρεχουσών και μελλοντικών κλινικών δοκιμών είναι εάν η θεραπεία του Μεταβολικού Συνδρόμου μειώνει τον κίνδυνο των καρδιαγγειακών ασθενειών.

Πίνακας 3. Μεταβολικό Σύνδρομο και κίνδυνος καρδιαγγειακής νόσου

	Ηνωμένες Πολιτείες NHANES III	WOSCOP	Kuopio	DECODE
OR	2.07	2.75	2.9 με 4.2	Αντρες 2.26 Γυναίκες 2.78

DECODE Diabetes Epidemiology: Collaborative Analysis Of Diagnostic Criteria in Europe; NHANES III National Health And Nutrition Examination Survey III; Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study; WOSCOP West Of Scotland Coronary Prevention.

1.1.7.2. CRP και Μεταβολικό Σύνδρομο

Στα παχύσαρκα άτομα και στα άτομα με Μεταβολικό Σύνδρομο, η CRP του πλάσματος και οι συγκεντρώσεις αντιποκίνης είναι αυξημένες, σε αντίθεση με την αντιπονεκτίνη που είναι μειωμένη. Οι συγκεντρώσεις της CRP (C – αντιδρώσας πρωτεΐνης) σχετίζονται άμεσα με την ποσότητα του σωματικού λίπους, όπως εκτιμούνται ανθρωπομετρικά με το BMI και κυρίως με το ενδοσπλαχνικό λίπος (η εκτίμηση εξαρτάται από την περιφέρεια μέσης). Η απώλεια βάρους με υποθερμιδικές δίαιτες ή χειρουργική επέμβαση, μειώνει τις συγκεντρώσεις της CRP σε υγιή άτομα, μέσης ηλικίας και μετεμμηνοπαυσιακές παχύσαρκες γυναίκες και παχύσαρκους άντρες^{35,36}. Στοιχεία από προοπτικές πληθυσμιακές μελέτες δείχνουν ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις CRP στο πλάσμα είναι ένας ισχυρός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας καρδιαγγειακών παθήσεων (United States Physicians Health Study,

MONICA Augsburg cohort study, MRFIT, Women's Health Study)^{37,38}. Η CRP δεν είναι απλά ένας δείκτης φλεγμονής, αλλά φαίνεται ότι συμμετέχει ενεργά στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που οδηγεί σε αθηροσκλήρωση³⁹.

Η σχέση μεταξύ CRP, Μεταβολικού Συνδρόμου και καρδιαγγειακών παθήσεων έχει εξεταστεί σε μια μεγάλη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 14719 υγιείς γυναίκες⁴⁰. Η CRP φάνηκε να συσχετίζεται με μεμονωμένα χαρακτηριστικά του Μεταβολικού Συνδρόμου. Οι γυναίκες που είχαν τα περισσότερα χαρακτηριστικά του Μεταβολικού Συνδρόμου εμφάνιζαν υψηλότερη CRP στο πλάσμα. Η προγνωστική τιμή της CRP, μεγαλύτερη από 3 mg/L για την εμφάνιση καρδιαγγειακών επιπλοκών, ήταν παρόμοια με εκείνη του Μεταβολικού Συνδρόμου⁴⁰. Πρόσφατα σε μια άλλη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 30111 γυναίκες και 16695 άνδρες φάνηκε ότι η CRP παρέμεινε ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για καρδιοπάθειες μόνο στους άνδρες με ή χωρίς Μεταβολικό Σύνδρομο⁴¹. Ως εκ τούτου, η CRP προσθέτει προγνωστικές πληροφορίες για το Μεταβολικό Σύνδρομο, και οπωσδήποτε περαιτέρω μελέτες θα βοηθήσουν να αποσαφηνισθεί αν η CRP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναπληρωματικός δείκτης για το Μεταβολικό Σύνδρομο καθώς και η προγνωστική της αξία για καρδιαγγειακά επεισόδια.

1.1.7.3. Λιπώδης ιστός – αντιποκίνες και CRP. Σύνδεση με το Μεταβολικό Σύνδρομο.

Η παχυσαρκία και κυρίως η ενδοσπλαχνική παχυσαρκία, είναι ο πιο εμφανής φαινότυπος του Μεταβολικού Συνδρόμου. Η δραματική αύξηση του ποσοστού παχυσαρκίας στους ενήλικες και στους εφήβους ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την αυξημένη επίπτωση του Μεταβολικού Συνδρόμου στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη. Ο λιπώδης ιστός δεν αντιμετωπίζεται πλέον σαν παθητικός αποθηκευτικός χώρος των τριγλυκεριδίων και των FFAs^{42,43}. Καθώς αναπτύσσονται τα προλιποκύτταρα διαφοροποιούνται σε ώριμα λιποκύτταρα, και αποκτούν την ικανότητα να συνθέτουν πάνω από εκατό πρωτεΐνες, κυρίως ένζυμα, κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες, που εμπλέκονται στην ομοιόσταση της ενέργειας⁴³. Τα ώριμα λιποκύτταρα είναι ενεργά ενδοκρινικά και παρακρινικά κύτταρα που εκκρίνουν υπεράριθμα μόρια που συμμετέχουν σε διάφορες μεταβολικές διαδικασίες⁴². Πολύ πρόσφατα, ο λιπώδης ιστός, θεωρήθηκε επίσης ότι είναι πλούσιος σε προφλεγμονώδεις ουσίες, πολλές από τις οποίες είναι κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες και ορμόνες που συνεισφέρουν στην προφλεγμονώδη

κατάσταση και μεσολαβούν στον τραυματισμό των αγγείων και στην Ινσουλινοαντίσταση, που τελικά επηρεάζει την καρδιαγγειακή λειτουργία³⁹. Στις προφλεγμονώδεις αντιποκυτοκίνες ή αντιποκίνες, συμπεριλαμβάνονται ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNFα), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η λεπτίνη, ο ανασταλτικός παράγοντας ενεργοποίησης του πλασμινογόνου, το αγγειοτενσिनογόνο, η ρεξιστίνη και πρόσφατα η CRP^{11,39}.

Η στενή συσχέτιση του βαθμού παχυσαρκίας και των συγκεντρώσεων CRP σε προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι ο λιπώδης ιστός είναι μια πιθανή πηγή της CRP. Η CRP εκφράζεται στον λιπώδη ιστό, στα ώριμα και στα αναπτυσσόμενα λιπώδη κύτταρα^{39,44,45} ενώ το αγγελιοφόρο RNA εκφράζεται στο λιπώδη ιστό, στα ώριμα λιποκύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και λίγο λιγότερο στα προλιποκύτταρα^{45,46}. Ιδιαίτερα, υπερέκφραση του RNA εντοπίζεται στα ώριμα λιποκύτταρα των παχύσαρκων ασθενών. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις CRP που παρατηρούνται στα παχύσαρκα άτομα και στα άτομα με Μεταβολικό Σύνδρομο μπορεί να οφείλονται στην αυξημένη παραγωγή CRP στο λιπώδη ιστό^{45,46}. Μελλοντικές μελέτες θα βοηθήσουν να αποσαφηνισθεί ο ρόλος των αντιποκινών, κυρίως της CRP, η συσχέτισή τους με την παχυσαρκία, το Μεταβολικό Σύνδρομο και την αθηροσκλήρωση^{11,39}.

Συμπερασματικά, και καθώς η Ελλάδα είναι πρώτη στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε συχνότητα παχυσαρκίας ενηλίκων και δεύτερη στην παιδική παχυσαρκία, ενώ παράλληλα τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου στο Δυτικό κόσμο, καθίσταται αναγκαία η εντατικοποίηση της έρευνας για την εντόπιση γενετικών δεικτών στον Ελληνικό πληθυσμό, οι οποίοι να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την προληπτική αντιμετώπιση ατόμων με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση Μεταβολικού Συνδρόμου.

1.2. APOA-V

1.2.1. Γενικά

Ένα γονίδιο που φαίνεται να συμμετέχει στη γενετική βάση του Μεταβολικού Συνδρόμου είναι και το ApoA-V που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της απολιποπρωτεΐνης A-V. Η απολιποπρωτεΐνη άλφα πέντε (apolipoprotein A-V) ανακαλύφθηκε το 2001⁴⁷ και έχει αναγνωρισθεί σαν μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ηπατική σύνθεση, έκκριση και υδρόλυση των τριγλυκεριδίων αλλά και στον καθαρισμό από την κυκλοφορία των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών⁴⁸.

Διαταραχές στο μεταβολισμό της ApoA-V και πολυμορφισμοί στο γονίδιό της φαίνεται να συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα, αυξάνοντας τον κίνδυνο καρδιαγγειακών επιπλοκών και την εμφάνιση του Μεταβολικού Συνδρόμου^{49,50}.

1.2.2. Απολιποπρωτεΐνες

Οι λιποπρωτεΐνες είναι ετερογενή μεγαλομοριακά σύμπλοκα λιπιδίων και ειδικών πρωτεϊνών, των απολιποπρωτεϊνών, που διασφαλίζουν τη μεταφορά στη συστηματική κυκλοφορία και τη διανομή στους ιστούς λιπιδίων (χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια) και λιποδιαλυτών μορίων (βιταμίνες και ορισμένα φάρμακα). Διαχωρίζονται με βάση την πυκνότητά τους σε πέντε κλάσματα: τα χυλομικρά, τις VLDL (πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες), τις IDL (ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες), τις LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες) και τις HDL (υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες).

Οι απολιποπρωτεΐνες αποτελούν το πρωτεϊνικό μέρος των λιποπρωτεϊνών. Η κύρια λειτουργία τους είναι η μεταφορά λιπιδίων εντός και εκτός της κυκλοφορίας του αίματος. Πολλές απολιποπρωτεΐνες, κατά συνέπεια, έχουν αποκτήσει πολύ εξειδικευμένες λειτουργίες. Οι πιο σημαντικές είναι⁵¹:

- η απολιποπρωτεΐνη ApoA-I που δεσμεύει τα λιπίδια των HDL και ενεργοποιεί το ένζυμο εστεροποίησης της χοληστερόλης (LCAT)
- η ApoA-II που μετατοπίζει την ApoA-I από την επιφάνεια των HDL
- η ApoA-IV που συμμετέχει στα χυλομικρά και επίσης ενεργοποιεί το ένζυμο εστεροποίησης της χοληστερόλης (LCAT)
- η ApoB-48 η οποία είναι ισχυρά συνδεδεμένη με τα χυλομικρά
- η ApoB-100 που είναι δομικό πρωτεϊνικό στοιχείο των VLDL και των LDL και συμμετέχει στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας,

- η ApoE που είναι συστατικό των χυλομικρών, των VLDL, των LDL και των HDL και σημαντικός παράγοντας που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση μεταξύ λιποπρωτεϊνών και κυτταροϋποδοχέων
- η ApoC-I που ενεργοποιεί την LPL (λιποπρωτεϊνική λιπάση) και συνεπώς έχει ρυθμιστικό ρόλο στη λιπόλυση και την αποικοδόμηση των τριγλυκεριδίων
- η ApoC-II έχει ίδια δράση με την προηγούμενη και συμμετέχει στο μεταβολισμό των χυλομικρών και των VLDL
- η ApoC-III η οποία αναστέλλει την LPL

Τελευταία ανακαλύφθηκε η απολιποπρωτεΐνη ApoA-V, η οποία φαίνεται ότι σχετίζεται με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων (TG) στο πλάσμα⁵⁰.

1.2.3. ApoA-V

Η ApoA-V, είναι μια απολιποπρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα, η οποία εκφράζεται αποκλειστικά στο συκώτι και φαίνεται να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των τριγλυκεριδίων. Περιγράφηκε ανεξάρτητα από δύο ομάδες. Η πρώτη χρησιμοποίησε συγκριτική ανάλυση της γενωμικής αλληλουχίας⁴⁷ και η δεύτερη αναγνώρισε το γονίδιο ApoA-V μετά από αυξημένη έκφραση του γονιδίου⁵².

Επειδή η συγκέντρωσή της στο πλάσμα είναι περίπου το ένα χιλιοστό σε σχέση με τη συγκέντρωση κάποιων άλλων απολιποπρωτεϊνών (24 έως 406 μg/L), η λειτουργία της δεν είχε αποσαφηνισθεί αρχικά.

Διάφοροι πολυμορφισμοί του γονιδίου ApoA-V φαίνεται ότι σχετίζονται με αυξημένη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στο πλάσμα^{53,54} και με οικογενή συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία⁵⁵.

1.2.4. Δομή και σύνθεση

Η απολιποπρωτεΐνη ApoA-V, παράγεται από τα κύτταρα του ήπατος, έχει μοριακή μάζα ίση με 38,905 Da και αποτελείται από 366 αμινοξέα. Η διαφορά της ανθρώπινης απολιποπρωτεΐνης ApoA-V από άλλα είδη, είναι ότι έχει τέσσερα αμινοξέα τρυπτοφάνης (στις θέσεις 5, 97, 147 και 325), πέντε αμινοξέα τυροσίνης (στις θέσεις 7, 87, 109, 171 και 270) και ένα αμινοξύ κυστεΐνης στη θέση 204. Όσον αφορά τη δομή της, εμφανίζει δομή α-έλικας με κάποια κενά μεταξύ των αμινοξέων

10 και 13, 191 και 194, 240 και 249, 293 και 299, όπως και δομή β-επιφάνειας και β-στροφής. Βέβαια, δε διακρίνεται καλά η δομή της, εκτός από τις πολύ καλά διακριτές α-έλικες μεταξύ των αμινοξέων 169 και 246. Σε σχέση με τις ApoA-I και ApoA-IV, είναι περισσότερο υδροφοβική, παρότι είναι το ίδιο αμφιπαθητική με τις προηγούμενες. Όσον αφορά τη συγγένεια σύνδεσης με τα λιπίδια, είναι ίση με αυτή της ApoA-I. Συνεπώς έχει μια πολύπλευρη δομή. Η περιοχή που αποτελείται από τα αμινοξέα 1-60 είναι μια υδροφιλική και μέτρια αμφιπαθητική περιοχή. Από το 61-170, είναι πολύ υδροφοβική και αδύναμα αμφιπαθητική, ενώ το διάστημα μεταξύ των αμινοξέων 171-245 περιλαμβάνει 3 πολύ υδροφοβικές και ισχυρά αμφιπαθητικές α-έλικες, οι οποίες εμφανίζουν μεγάλη επιφανειακή δραστηριότητα.

Τα διαστήματα μεταξύ των αμινοξέων 246-295 και 296-366, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη πολλών προλινών, συνθέτουν περιοχές σχετικά υδροφιλικές που όμως δεν εμφανίζουν κάποιο άλλο ισχυρό χαρακτηριστικό. Άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό της, είναι ότι κυκλοφορεί στο πλάσμα κυρίως συνδεδεμένη στις HDL, VLDL και τα χυλομικρά, καθώς εμφανίζει χαμηλή διαλυτότητα σε pH από 3,5 έως 9,5. Τέλος, μια περιοχή που πιθανόν να ευθύνεται για τη σύνδεσή της με την επιφάνεια των λιπιδίων, είναι αυτή μεταξύ των αμινοξέων 171-188, ένα α-ελικοειδές τμήμα που είναι πολύ υδρόφοβο και ισχυρά αμφιπαθητικό⁵⁶.

1.2.5. Λειτουργίες

Έχουν προταθεί δύο θεωρίες για τη λειτουργία της ApoA-V. Η μία είναι ότι ενεργοποιεί την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων από την LPL^{57,58} και η άλλη ότι μπορεί να καθυστερήσει ή να μειώσει την ηπατική σύνθεση των VLDL⁵⁹.

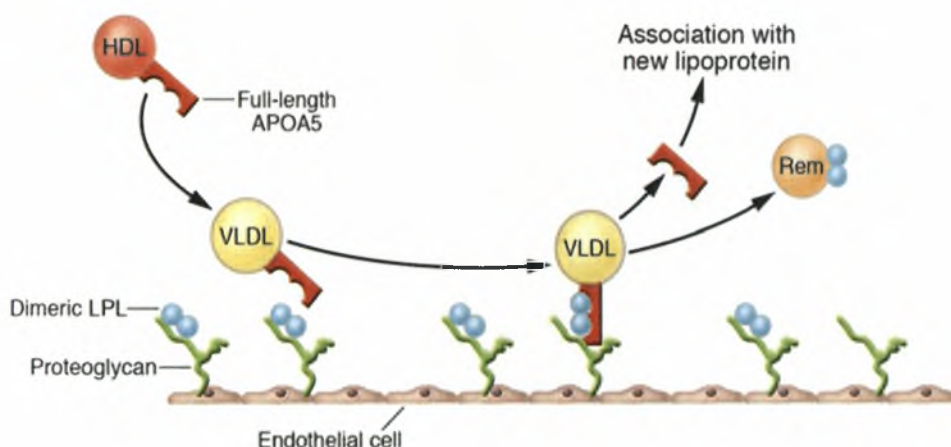
1.2.5.1. Η ApoA-V ως ενεργοποιητής της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία του αίματος. Δεσμευμένη σε ενδοθηλιακές πρωτεογλυκάνες, δρα κυρίως στους σκελετικούς μύες και στο λιπώδη ιστό, προμηθεύοντάς τους με λιπαρά οξέα ως ενεργειακό υπόστρωμα.

Πως λοιπόν μπορεί η ApoA-V, η οποία βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση στο πλάσμα, να επηρεάζει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων; Συνήθως, η LPL μετράται από την υδρολυτική της δραστηριότητα στο πλάσμα, μετά από ένεση ηπαρίνης. Βρέθηκε ότι η LPL εμφάνιζε χαμηλότερη δραστηριότητα σε άτομα με

έλλειψη της ApoA-V⁵⁵. Επίσης βρέθηκε ότι η ApoA-V επηρεάζει την λιπόλυση των γαλακτωμάτων που είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια ενισχύοντας τη δράση της LPL⁵⁸.

Το μοντέλο με το οποίο η ApoA-V δρα εξωκυτταρικά προτείνει τα εξής: με το να συνδέεται με χυλομικρά ή με VLDL σε μια περιοχή της και με ενδοθηλιακές πρωτεογλυκάνες και με την LPL σε μια άλλη, η ApoA-V σταθεροποιεί το ενδοθηλιακό λιπολυτικό σύστημα και επομένως αυξάνει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων από την LPL. Κατά συνέπεια, η ApoA-V μπορεί να σταθεροποιήσει τη διμερή LPL, ή να καθορίσει το σχήμα των λιποπρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια, ώστε να μετατραπούν σε ένα καλύτερο υπόστρωμα για την LPL. Από τη στιγμή που η ApoA-V μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί και να μεταφερθεί σε κάποια άλλο λιποπρωτεϊνικό μόριο μετά την υδρόλυση, πολύ μικρή συγκέντρωσή της στο πλάσμα είναι σε θέση να πραγματοποιήσει αυτό το έργο⁶⁰.

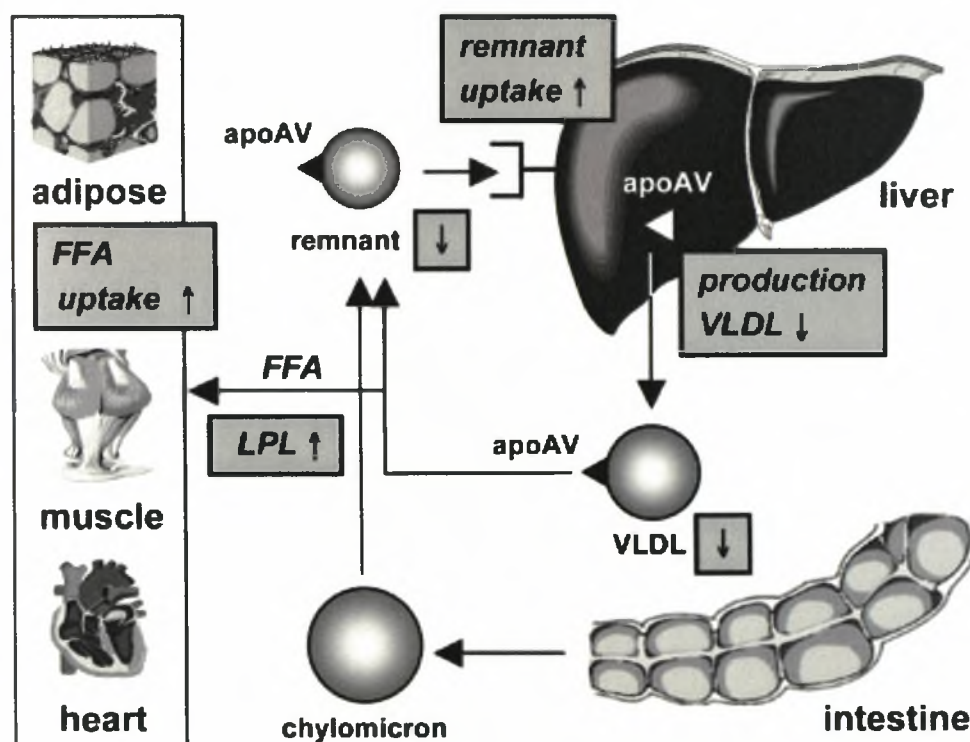


Εικόνα 3. Η μείωση των TGs από την ApoA-V. Λιποπρωτεΐνες, οι οποίες είναι πλούσιες σε TGs, όπως η VLDL, υδrolύονται από τη λιπολυτική δράση της διμερούς LPL, η οποία είναι δεσμευμένη σε πρωτεογλυκάνες στο αγγειακό ενδοθήλιο. Η ApoA-V κατευθύνει τα μόρια των VLDL στις πρωτεογλυκάνες, και τα τοποθετεί κοντά στην LPL. Συγχρόνως, ενεργοποιεί τη δεσμευμένη LPL, είτε σταθεροποιώντας τη διμερή κατασκευή της είτε με το να συνδέεται με κάποια αλλοστερική περιοχή της. Μετά την υδρόλυση, τα υπολείμματα απελευθερώνονται στην κυκλοφορία και η ApoA-V μπορεί να μεταφερθεί και να ξαναχρησιμοποιηθεί από άλλα μόρια VLDL. Σε αυτή τη φάση, η HDL δρα σα δότης της ApoA-V, για την υδρόλυση των

χυλομικρών που προέρχονται από το έντερο. Έτσι, η ApoA-V χαρακτηρίζεται ως ισχυρός ενεργοποιητής του λιπολυτικού συστήματος.

1.2.5.2. Η ApoA-V και η ενδοκυτταρική της δράση

Επειδή η ApoA-V δεν κυκλοφορεί ελεύθερη στο αίμα σε φυσιολογικό pH, και επειδή η συγκέντρωσή της στο πλάσμα είναι πολύ μικρή, είναι πιθανό να δρα και ενδοκυτταρικά και να μειώνει τη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων στο αίμα. Έχει προταθεί ότι οι απολιποπρωτεΐνες που έχουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τα λιπίδια και χαμηλή ελαστικότητα, όπως η ApoA-V, μειώνουν το χρόνο του δεύτερου σταδίου της επανασύνδεσης των VLDL στο ήπαρ. Πιθανότατα, η ApoA-V καθυστερεί την επανασύνδεση των VLDL, εμποδίζοντας την επέκταση των τμημάτων των VLDL ή καθυστερώντας την μετακίνηση και την έκκρισή τους με το να συνδέεται με αυτές⁶¹.



Εικόνα 4. Στην εικόνα φαίνονται οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης της ApoA-V, μέσα από τους οποίους μειώνονται τα επίπεδα των TGs. Επηρεάζει τις λιποπρωτεΐνες σε πολλά επίπεδα, τόσο στη σύνθεση όσο και στο καταβολισμό τους. (1) Μειώνει την ηπατική παραγωγή VLDL-TG, (2) Αυξάνει την παραγωγή υπολειμμάτων λιποπρωτεϊνών ενισχύοντας τη δράσης της LPL. (3) Αυξάνει την επαναπρόσληψη

των λιποπρωτεϊνικών υπολειμμάτων, ενισχύοντας την ικανότητα σύνδεσης του υποδοχέα της LDL⁶².

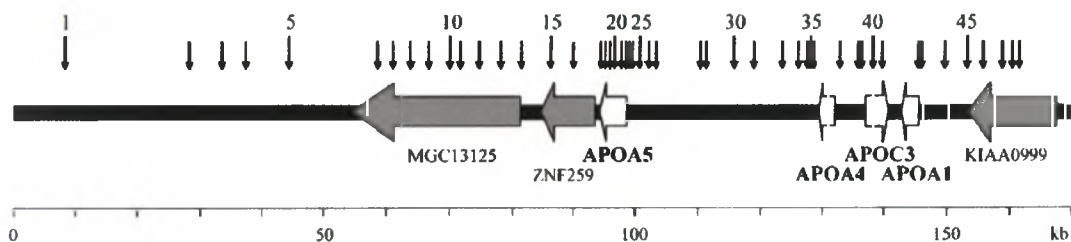
1.2.6. Το γονίδιο της ApoA-V

Το γονίδιο ApoA-V βρίσκεται μέσα στη γονιδιακή συστοιχία APOA1/C3/A4 και απέχει περίπου 30 kb από το γονίδιο ApoA-IV, στην ανθρώπινη χρωμοσωμική

Ch.11



περιοχή 11q23. Συνίσταται από 4 εξόνια με ένα υψηλά συντηρημένο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης. Η πρωτεΐνη ApoA-V που αποτελεί μεταφραστικό στόχο του γονιδίου, εκφράζεται στο συκώτι, εκκρίνεται στο πλάσμα και ρυθμίζει τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων. Στο μηχανισμό της δράσης της εμπλέκονται οι υψηλής πυκνότητας (HDL) και οι πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL)⁶⁰ (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Διάγραμμα της γονιδιακής συστοιχίας APOA1/C3/A4 στη χρωμοσωμική περιοχή 11q23. Όλα τα γονίδια απεικονίζονται με οριζόντια βέλη. Τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών απεικονίζονται με λευκό χρώμα με τα ονόματά τους κάτω από τα βέλη. Η κατά προσέγγιση θέση του κάθε SNP υποδεικνύεται από τα κατακόρυφα βέλη⁶³.

1.2.7. Πολυμορφισμοί (SNPs)

Πολυμορφισμός μονονουκλεοτιδίου (SNP) είναι η υποκατάσταση μιας μόνο βάσης στην αλληλουχία του DNA. Η συχνότητά του είναι μια φορά ανά 1.000-2.000 νουκλεοτίδια και στην περίπτωση που εντοπίζεται μέσα σε γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μιας, έστω και ελάχιστα, τροποποιημένης πρωτεΐνης ή ενζύμου, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη βιοχημεία και το μεταβολισμό του ατόμου. Πολυμορφισμοί που εντοπίζονται σε ρυθμιστικά στοιχεία που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων, όπως ο υποκινητής,

μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών σε σημαντικό βαθμό. Οι πολυμορφισμοί των SNPs εντοπίζονται και σε περιοχές του DNA που δεν αντιστοιχούν σε γονίδια και μάλιστα η συχνότητά τους σ' αυτές τις περιοχές είναι υψηλότερη. Πολλά πολυπαραγοντικά νοσήματα, μπορούν να συσχετισθούν με την εμφάνιση συγκεκριμένων SNPs, τα οποία αυξάνουν την προδιάθεση των ατόμων που τα φέρουν για εμφάνιση συγκεκριμένων ασθενειών.

Μέχρι σήμερα, περισσότεροι από 10 απλοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της ApoA-V έχουν παρατηρηθεί, οι οποίοι επέτρεψαν την κατασκευή αρκετών απλότυπων^{64,65}. Πολλές μελέτες συσχετίζουν αυτούς τους πολυμορφισμούς με τα λιπίδια του πλάσματος^{49,71,75}. Μερικοί από αυτούς είναι:

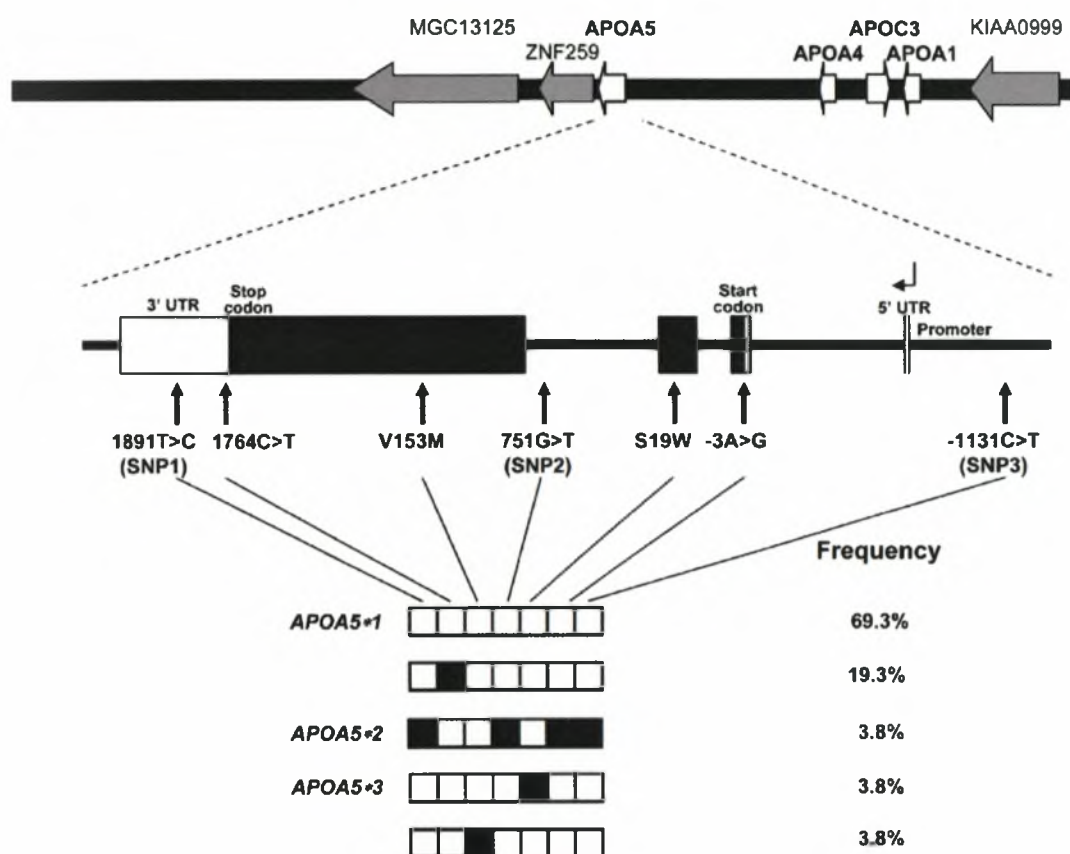
- -1131 T>C
- -3 A>G
- 56 C>G (S19W)
- 751 G>T (IVS 3 + 476 G>A)
- V153M
- 1764 C>T
- 1891 T>C (1259T>C)

1.2.8. Απλότυποι

Έχουν αναγνωρισθεί πέντε κοινοί απλότυποι του γονιδίου ApoA-V, οι οποίοι ορίζονται από επτά SNPs. Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζουν οι απλότυποι ApoA5*2 και ApoA5*3, καθώς συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα^{66,67}. Οι πολυμορφισμοί των υπόλοιπων απλότυπων είτε δεν είναι συνηθισμένοι είτε δεν συσχετίζονται με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στο αίμα. Οι σημαντικότεροι είναι⁶⁴:

1. ο αγρίου τύπου απλότυπος ApoA5*1, ο οποίος χαρακτηρίζεται από κοινά αλληλόμορφα για τους επτά πολυμορφισμούς και παρατηρείται σε συχνότητα 69% στους Καυκάσιους⁶³.
2. ο ApoA5*2, ο οποίος ορίζεται από σπάνια αλληλόμορφα για τέσσερις πολυμορφισμούς, -1131T>C, -3A>G, IVS 3 + 476 G>A και 1259T>C, με συχνότητα εμφάνισης 4% σε Καυκάσιους⁶⁸

- ο ApoA5*3, ο οποίος ορίζεται από ένα σπάνιο αλληλόμορφο του πολυμορφισμού 56C>G (S19W) με συχνότητα εμφάνισης 4% σε Καυκάσιους⁶⁸ (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Οι απλότυποι του ApoA-V. Οι θέσεις των επτά SNPs που περιλαμβάνει ο απλότυπος του ApoA-V φαίνονται στο πάνω μέρος. Τα εξόνια παριστάνονται σαν κουτιά, ενώ οι μαύρες περιοχές φανερώνουν την κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου. Οι απλότυποι φαίνονται με διαγράμματα στο υπόλοιπο μισό. Τα άσπρα τετράγωνα δείχνουν τα κοινά αλληλόμορφα, τα μαύρα τετράγωνα τα σπάνια αλληλόμορφα ενός SNP⁶⁴.

Οι απλότυποι ApoA5*2 και ApoA5*3 έχουν συχνότητα εμφάνισης στο λευκό πληθυσμό σε ποσοστό 15%^{47,64}. Τα σπάνια αλληλόμορφα των απλότυπων ApoA5*2 και ApoA5*3 των πολυμορφισμών -1131T>C και S19W υπάρχουν σε αυξημένη συχνότητα στους μαύρους και ισπανικής καταγωγής πληθυσμούς. Οι απλότυποι

ApoA5*2 και ApoA5*3 έχουν συχνότητα εμφάνισης από 25-50% σε μαύρους, ισπανικής καταγωγής άτομα και λευκούς, υποδηλώνοντας ότι υπάρχει μεγάλο ποσοστό ατόμων με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα εξαιτίας των πολυμορφισμών του γονιδίου ApoA-V. Οι απλότυποι αυτοί σχετίζονται με περίπου 30-60% υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων μετά τη λήψη γεύματος σε σχέση με τον αγρίου τύπου απλότυπο^{69,70}. Επίσης, οι απλότυποι εκτός από την επίδραση που έχουν στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του πλάσματος σε διαφορετικές εθνικότητες, ηλικίες και φύλο, φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο και στην κατάσταση της οικογενούς συνδυασμένης υπερλιπιδαιμίας⁵⁵. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ακόμη ότι οι πολυμορφισμοί του ApoA-V μπορούν να επηρεάζουν την ομοιοστάση της χοληστερόλης και πιθανόν να παίζουν ρόλο στην υπερτριγλυκεριδαιμία που συνοδεύεται από διαβήτη και φλεγμονή⁵⁴.

1.2.9. Ο πολυμορφισμός -1131T>C

Ο πολυμορφισμός -1131T>C προκύπτει από την αντικατάσταση της θυμίνης από κυτοσίνη και εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ApoA-V. Τα άτομα που εμφανίζουν τον πολυμορφισμό και στα δύο αλληλόμορφα χαρακτηρίζονται ομοζυγώτες στον πολυμορφισμό (CC), ενώ αν ο πολυμορφισμός εμφανίζεται μόνο στο ένα αλληλόμορφο ονομάζονται ετεροζυγώτες (TC). Τα άτομα χωρίς πολυμορφισμό είναι ομοζυγώτες φυσιολογικοί (TT).

Η συσχέτιση του πολυμορφισμού -1131C με υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων και αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών επιπλοκών και Μεταβολικού Συνδρόμου έχει δειχθεί σε αρκετές εθνότητες, όπως Κινέζους, Ιάπωνες, Αμερικανούς, Ούγγρους και Γάλλους^{49,71-75}. Το μοντέλο της γραμμικής παλινδρόμησης προβλέπει ότι οι φορείς του σπάνιου αλληλόμορφου έχουν αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα κατά 21 mg/dL, αυξημένη VLDL χοληστερόλη κατά 8 mg/dL και μειωμένη HDL κατά 2 mg/dL. Επίσης οι φορείς του C αλληλόμορφου έχουν αυξημένα χυλομικρά, υψηλότερη LDL, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και 8-επι-προσταγλαδίνη F_{2α} (ένας δείκτης οξειδωτικού στρες) μετά από τη λήψη γεύματος, σε σχέση με τα άτομα που είναι φορείς του κοινού γονότυπου⁵⁴.

2.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση του πολυμορφισμού -1131T>C του γονιδίου ApoA-V στη γενετική προδιάθεση υπέρβαρων και παχύσαρκων ατόμων του ελληνικού πληθυσμού, με καταγωγή από την Κεντρική και Νότια Ελλάδα, σχετικά με την εμφάνιση Μεταβολικού Συνδρόμου στον συγκεκριμένο πληθυσμό.

2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Υλικά

Απομόνωση DNA	Αντίδραση RFLP
Οδοντικά βουρτσάκια Tepe Brush	Ρυθμιστικό διάλυμα πέψης (Buffer 10X)
Πιπέτες ακριβείας (Gilson)	Περιοριστική ενδονουκλεάση: MseI (10units/ml)
Φιαλίδια Eppendorf των 1,5 και 2 ml	Ηλεκτροφόρηση των RFLP σε πηκτή Πολυακρυλαμίδης
Στατώ	Ποτήρι ζέσεως 200 ml
Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)	Μαγνήτης ανάδευσης
Πρωτεΐνάση K (10 µg/mL)	Ογκομετρικοί κύλινδροι 20 & 100 ml
Φαινόλη	Χωνί μετάγγισης
Χλωροφόρμιο	Χαρτί διήθησης
Οξικό νάτριο NaOAc 3 M, pH 5,2	Ουρία
Αιθανόλη 100%	Ακρυλαμίδη 99%
Αιθανόλη 70%	Δις-ακρυλαμίδη
Πιπέτα Pasteur	TBE 10X
ddH ₂ O	Τετραμεθυλεθυλενδιαμίνη (TEMED)
Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος	Ammonium Persulfate 20% w/v (APS)
Απαγωγός εστία εργασίας	TBE 1X
Ποσοτικός προσδιορισμός του εξαγόμενου DNA	Μάρτυρας (DNA ladder 100bp)
Πλαστικές κυβέττες φωτομέτρησης	Συσκευή παρασκευής πηκτής πολυακρυλαμίδης
Οπτικής διαδρομής 10mm	Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
Φασματοφωτόμετρο UV-VIS	Ζεύγος τζαμιών
Αντίδραση PCR	Spacers
Ρυθμιστικό διάλυμα (10X PCR Buffer)	Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης
Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl ₂) 50 mM	Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silverstaining)
BSA 1 mg/ml	Ζελατίνη
Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 10mM το καθένα	Μεταλλικό δοχείο χρώσης
Εκκινητές (Primers)	Ογκομετρικοί κύλινδροι 1000 ml
Taq DNA πολυμεράση 5U/µL	Ποτήρι ζέσεως 200 ml
Θερμικοί κυκλοποιητές	Μαγνήτης ανάδευσης
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	Αιθανόλη 100%
Κωνική φιάλη 100 ml	Οξικό οξύ
Ογκομετρικός κύλινδρος 50 ml	Νιτρικός άργυρος (AgNO ₃)
Αγαρόζη	Κανστικό Νάτριο (NaOH)
TAE 1X	Βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH ₄)
Βρωμιούχο Αιθίδιο 1 µg/ml	Φορμαλδεΰδη (Formaldehyde)
Parafilm	Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης
Διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer)	Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
Μάρτυρας (DNA ladder 100bp)	ddH ₂ O
Συσκευή παρασκευής της πηκτής	Φούρνος μικροκυμάτων
Φούρνος μικροκυμάτων	Αναρροφητής
Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης	Συσκευή προβολής πηκτής ακρυλαμίδης
Συσκευή U.V. ακτινοβολίας	Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή

2.2.2. Μέθοδοι

2.2.2.1. Πληθυσμός και Δείγμα μελέτης

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 51 δείγματα από άτομα με καταγωγή από την Κεντρική και Νότιο Ελλάδα, υπέρβαρα και παχύσαρκα, με ή χωρίς Μεταβολικό Σύνδρομο. Συνολικά 20 άτομα με Μεταβολικό Σύνδρομο (8 άντρες, 12 γυναίκες, μέσος όρος ηλικίας 39.65 ± 3.42 έτη και εύρος: 11-62 ετών) επιλέχθηκαν με τα κριτήρια της αναθεωρημένης έκδοσης του NCEP ATP III^{2,3} σύμφωνα με την οποία, η ύπαρξη Μεταβολικού Συνδρόμου ορίζεται με την παρουσία τουλάχιστον τριών από τα ακόλουθα πέντε κριτήρια: Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI) > 25 αντί της περιφέρειας μέσης, τριγλυκερίδια ορού ≥ 150 mg/dl, HDL πλάσματος < 40 mg/dl για τους άνδρες και < 50 mg/dl για τις γυναίκες, συστολική αρτηριακή πίεση ≥ 130 mm Hg και διαστολική πίεση ≥ 85 mm Hg, γλυκόζη νηστείας > 100 mg/dl^{2,3}. Συνολικά 31 φανερά υγιή άτομα (13 άντρες, 18 γυναίκες, μέσος όρος ηλικίας 25.38 ± 3.38 έτη και εύρος: 5-72 ετών) χωρίς κλινικά ή εργαστηριακά σημεία Μεταβολικού Συνδρόμου επιλέχθηκαν ως άτομα ελέγχου.

Όλοι οι συμμετέχοντες έδωσαν τη συγκατάθεσή τους.

2.2.2.2. Ανθρωπομετρία

Το σωματικό βάρος των ατόμων μετρήθηκε με ζυγαριά ακριβείας στο πλησιέστερο 0,1 Kg και το ύψος μετρήθηκε με προσαρμοσμένο αναστημόμετρο στο πλησιέστερο 0,5 cm. Ο Δείκτης Μάζας Σώματος (Body Mass Index, BMI) υπολογίστηκε με τον τύπο $BMI = \text{Βάρος (Kg)} / \text{Υψος}^2 (\text{m}^2)$

Οι περιφέρεια μέσης και ισχίων μετρήθηκε με πλαστική μεζούρα στο πλησιέστερο 0,1 cm Η περιφέρεια μέσης μετρήθηκε απουσία ρουχισμού, στο μέσο της απόστασης μεταξύ του τελευταίου πλευρού και του άκρου του λαγόνιου οστού, περίπου στο ύψος του αφαλού. Η περιφέρεια ισχίων μετρήθηκε στο σημείο που παρουσίαζε τη μεγαλύτερη περίμετρο.

Η κατηγοριοποίηση των ατόμων σε υπέρβαρα και παχύσαρκα έγινε σύμφωνα με τις τιμές του BMI που έχει υιοθετήσει η Διεθνής Ομάδα Δράσης για την Παχυσαρκία (IOTF).

2.2.2.3. Εργαστηριακές Αναλύσεις

- Γενική εξέταση αίματος: αιματοκρίτης, αιμοσφαιρίνη, λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια, μέσος όγκος ερυθρών (MCV), μέση αιμοσφαιρίνη ερυθρών (MCH), μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ερυθρών (MCHC)
- Απομόνωση DNA από στοματικό παρέγχυμα
- Βιοχημικές εξετάσεις: γλυκόζη ορού, ολική χοληστερόλη ορού, HDL χοληστερόλη, τριγλυκερίδια ορού

2.2.2.4. Πίεση Αίματος

Η συστολική και διαστολική πίεση των ατόμων μετρήθηκε σε φάση ηρεμίας με χειροκίνητο σφυγμομανόμετρο τύπου FOCAL.

2.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Αρχή της μεθόδου

Το γενωμικό DNA για τις γενετικές αναλύσεις παραδοσιακά λαμβάνεται από δείγματα αίματος. Με τη διαθεσιμότητα της τεχνικής PCR η οποία απαιτεί μικρές ποσότητες DNA και δίνει υψηλής πιστότητας αποτελέσματα, μια αναίμακτη, απλή και φθηνότερη μέθοδος έχει γίνει αποδεκτή. Στηρίζεται στη λήψη DNA από στοματικά κύτταρα σε ποσότητα αρκετή για αρκετές PCR από ένα δείγμα. Η μέθοδος απαιτεί τη λήψη στοματικού παρεγχύματος με οδοντικά βουρτσάκια που τρίβονται στην αριστερή και δεξιά παρειά της στοματικής κοιλότητας αντίστοιχα. Στη συνέχεια τα οδοντικά βουρτσάκια τοποθετούνται σε μικροσωληνάρια. Το DNA απομονώνεται από τα στοματικά κύτταρα με μια γρήγορη μέθοδο χρησιμοποιώντας πρωτεΐνάση K, εκχυλίσεις με φαινόλη – χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Η ποσότητα του γενωμικού DNA που απομονώνεται κυμαίνεται από 1 έως 5 μg .

Τα βήματα της μεθόδου είναι τα ακόλουθα:

1. Τρίψιμο εκατέρωθεν των εσωτερικών παρειών της στοματικής κοιλότητας για 1 min αντίστοιχα με οδοντικά βουρτσάκια
2. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε φυγοκεντρικούς σωλήνες 1,5 ml
3. Προσθήκη 0,5 ml 0,2 M CH_3COONa
4. Προσθήκη 12,5 μL 20% SDS για τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών
5. Προσθήκη 5 μL πρωτεΐνάσης K (20 mg/ml) για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και επώαση σε θερμοκρασία 55°C για 1 h
6. Εκχύλιση με την προσθήκη 250 μL φαινόλης και 250 μL χλωροφόρμιου για την αποδιάταξη και απομάκρυνση των πρωτεϊνών
7. Φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 5 min για τον διαχωρισμό των φάσεων
8. Απομάκρυνση της υδατικής φάσης (300 – 400 μL) και τοποθέτηση της σε φυγοκεντρικούς σωλήνες 1,5 ml
9. Εκχύλιση με 500 μL χλωροφόρμιο για την απομάκρυνση της φαινόλης
10. Φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 5 min για τον διαχωρισμό των φάσεων
11. Συλλογή της υδατικής φάσης (400 μL) και τοποθέτησή της σε φυγοκεντρικούς σωλήνες 2 ml
12. Προσθήκη 50 μL 3M CH_3COONa και 1,25 ml αιθανόλη 100% για κατακρήμνιση του DNA
13. Επώαση στους -20°C ολονύκτια ή στους -80°C για 20 min

14. Φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 15 min
15. Αφαίρεση όλου του υπερκειμένου
16. Ξήρανση του ιζήματος στους 55°C για 5 min και επαναδιάλυση του DNA με την προσθήκη 100 μ L αποσταγμένου νερού (αποθήκευση στους -20°C).

2.2.3.1. Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του DNA

Η ποσότητα του DNA προσδιορίζεται φωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm, όπου μια μονάδα απορρόφησης (A_{260}) ισοδυναμεί με 50 μ g DNA/ml (1 A_{260} unit = 50 μ g/ml DNA). Το DNA για να θεωρηθεί καθαρό δεν πρέπει να περιέχει πρωτεΐνες ή RNA και ο έλεγχος γίνεται βάσει του λόγου των απορροφήσεων $A_{260}/A_{280} \approx 1.8$.

2.2.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

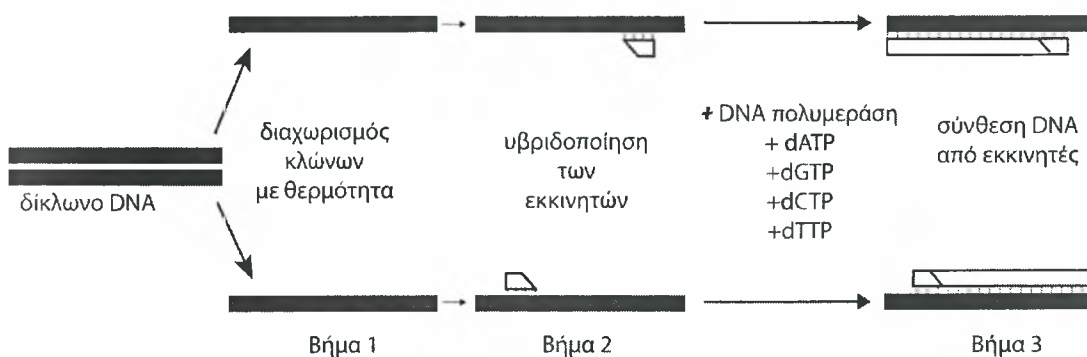
Βασική αρχή

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια τεχνική *in vitro* σύνθεσης πολλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA (DNA στόχος) με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων. Η τεχνική αυτή μιμείται το φυσιολογικό μηχανισμό του κυττάρου για τον πολλαπλασιασμό ειδικών τμημάτων DNA με τρόπο γρήγορο και αξιόπιστο. Η μεγάλη της αξία στηρίζεται στο ότι είναι μέθοδος γρήγορη, απλή, μικρού κόστους, αυτοματοποιημένη και απαιτεί μόνο ελάχιστες ποσότητες δείγματος. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι η ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία της.

Με την τεχνική PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση *in vitro* ενός τμήματος DNA. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών το DNA στόχος πολλαπλασιάζεται εκθετικά και ο τελικός αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αρχικό αριθμό των μορίων της αντίδρασης.

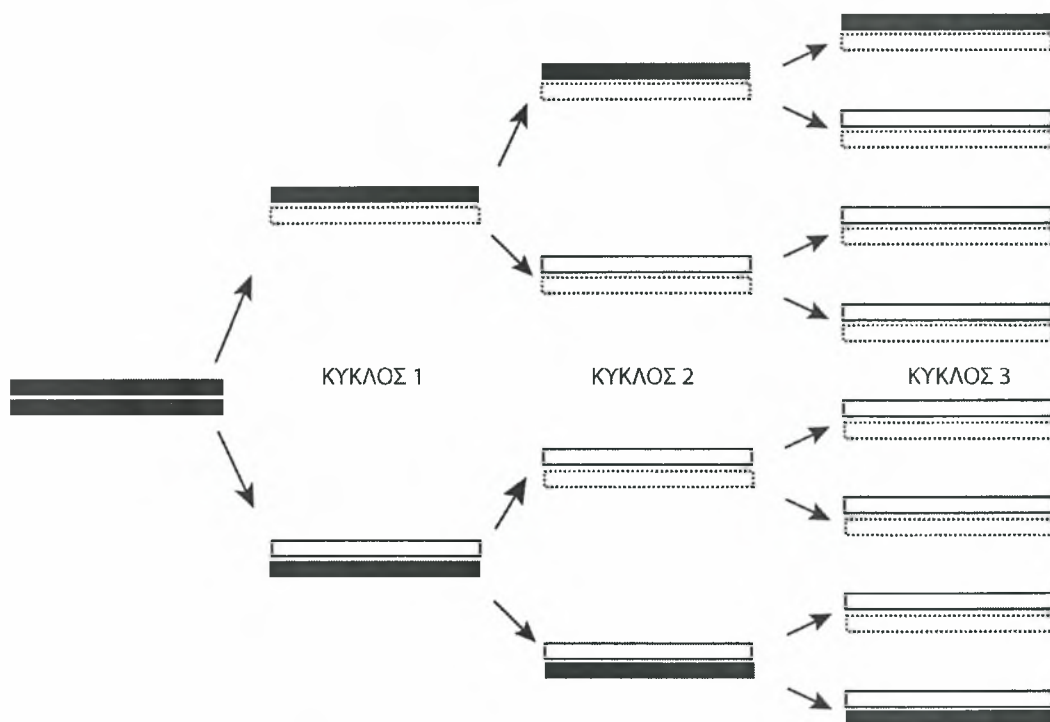
Στο DNA στόχο τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με DNA πολυμεράση, εκκινητικά μόρια (primers), δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης και μαγνήσιο, και υπόκεινται σε μια εναλλαγή θερμοκρασιών. Οι εκκινητές (primers) είναι δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (15-25 βάσεων), που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα για διαφορετικό κλώνο και με αντίθετο προσανατολισμό. Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Αρχικά το DNA-στόχος αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°C, για 5 min.
2. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 40-60°C για 30-60 sec. Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τους κλώνους του DNA στόχου.
3. Τέλος, ξεκινά η σύνθεση του νέου κλώνου του DNA, με την προσθήκη νουκλεοτιδίων, από το ένζυμο DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση), στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επεκτείνεται. Η διαδικασία της επιμήκυνσης πραγματοποιείται στους 72°C και ο χρόνος που διαρκεί εξαρτάται από το μήκος του τμήματος (~1min/kb).



Εικόνα 7: Τα στάδια της PCR. Στάδιο I: αποδιάταξη δίκλωνου DNA. Στάδιο II: Υβριδοποίηση των εκκινητών. Στάδιο III: Επιμήκυνση της αλυσίδας με την DNA πολυμεράση.

Έτσι σχηματίζονται δυο καινούργιες αλυσίδες DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δυο κλώνων του πρότυπου DNA. Η σειρά των τριών σταδίων, αποδιάταξης (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (annealing) και επέκτασης των εκκινητών με την σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension), αποτελούν έναν κύκλο της PCR. Ο επόμενος κύκλος ξεκινά πάλι από το στάδιο 1 (Εικόνα 7). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός του DNA στόχου, 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Εκθετική αύξηση των παραγόμενων μορίων κατά την PCR. Μετά το τέλος του 1^{ου} κύκλου το δίκλωνο DNA έχει διπλασιαστεί, μετά το τέλος του 2^{ου} κύκλου έχει τετραπλασιαστεί, ακολουθώντας εκθετική αύξηση της μορφής 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων.

Συστατικά της PCR

❶ Taq DNA πολυμεράση

Το ένζυμο DNA πολυμεράση είναι αυτό που καταλύει την επέκταση των εκκινητών. Χρησιμοποιώντας την θερμοάντοχη Taq DNA πολυμεράση είναι δυνατή η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών για τη μετουσίωση του DNA, την υβριδοποίηση των εκκινητών και τον πολυμερισμό. Χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση Biotaq DNA (Bioline) με συγκέντρωση 5U/μL και 1 unit/αντίδραση.

❷ Ολιγονουκλεοτίδια - Εκκινητές

Το μήκος των ολιγονουκλεοτιδίων που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές κυμαίνεται μεταξύ 18-30 νουκλεοτιδίων. Οι αλληλουχίες αυτές πρέπει να περιέχουν 40-60% γουανίνη και κυτοσίνη (G+C) και δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός διμερών κατά την διάρκεια της PCR. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εκτιμάται κάθε φορά βάση των σημείων τήξης τους, τα οποία όμως σημεία πρέπει να είναι παρόμοια για τους δυο εκκινητές.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τον πολυμορφισμό T-1131-C του γονιδίου ApoA-V είναι οι ακόλουθες:

For Primer: **5' CCC CAG GAA CTG GAG CGA AAT T-3'**

Rev Primer: **5' TTC AAG CAG AGG GAA GCC TGT A-3'**

Οι συγκεντρώσεις των εκκινητών ήταν 50 pmol/μL και σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 50pmol.

❸ Ρυθμιστικά διαλύματα

PCR Buffer [Σύσταση: 160mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCL (pH8.8 at 25°C), 0,1% Tween-20]. Η συγκέντρωσή του είναι 10x (Bioline).

MgCl₂

Τα ιόντα Mg²⁺ είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της Taq DNA πολυμεράσης. Απουσία των ελευθέρων ιόντων μαγνησίου, η DNA πολυμεράση είναι ανενεργή, ενώ σε περίσσεια αυτής η ακρίβεια του ενζύμου μειώνεται και είναι πιο πιθανή η πραγματοποίηση μη ειδικής ενίσχυσης. Η συγκέντρωσή του είναι 50 mM (Bioline).

BSA

Η συγκέντρωσή του είναι 1 mg/ml και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml

❹ dNTPs

Τα dNTPs χρησιμοποιούνται για την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA στόχου και έχουν συγκέντρωση 10 μM το καθένα

❺ Υπόστρωμα (50-200 ng)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων

PCR είναι η ακόλουθη:

1. Τοποθέτηση γενωμικού DNA (1 μL-100ng) σε φυγοκεντρικούς σωλήνες 0,2 ml. Το αρνητικό δείγμα, ίσου όγκου (1 μL), περιέχει αποσταγμένο νερό για τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης. Παρασκευάζεται το μίγμα των αντιδραστηρίων της PCR. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 4. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο.

Πίνακας 4. Μίγμα PCR	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ (μL)
H ₂ O	9.20
Primer R (50 pmol/μL)	1.00
Primer F (50 pmol/μL)	1.00
PCR Buffer 10x	1.50
MgCl ₂ (50 mM)	0.45
BSA (1 mg/ml)	0.15
dNTP's (10 mM)	0.50
Taq πολυμεράση (5U/μL)	0.20

2. Το μίγμα χωρίζεται στους φυγοκεντρικούς σωλήνες των 0,2 ml που περιέχουν το γενωμικό DNA και το αρνητικό δείγμα. Σε κάθε φυγοκεντρικό σωλήνα τοποθετούνται 14 μL από το μίγμα. Ο συνολικός όγκος του μίγματος για την PCR είναι 15 μL.

3. Οι φυγοκεντρικοί σωλήνες μεταφέρονται σε θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) και ακολουθούνται τα εξής στάδια:

Συνθήκες PCR

95 ⁰ C για 5 min	}	35 κύκλοι
95 ⁰ C για 45 sec		
59 ⁰ C για 45 sec		
72 ⁰ C για 45 sec		
72 ⁰ C για 10 min		

2.2.3.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο έλεγχος των προϊόντων της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris – Acetic acid – EDTA, pH 7.2 (TAE 1x). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA, στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH, οι φωσφορικές ομάδες των δεοξυριβονουκλεοτιδίων προσδίδουν αρνητικό φορτίο στο DNA. Παρουσία του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (TAE 1x), αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο (-), θα μετακινηθούν προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA κατά μήκος του πηκτώματος εξαρτάται κυρίως από τη μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των τμημάτων DNA που ηλεκτροφορούνται, άρα όσο πιο μεγάλο είναι το προϊόν της PCR τόσο καθυστερεί στο πήκτωμα, και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του πηκτώματος. Έτσι χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης, επιτυγχάνουμε τον επιθυμητό διαχωρισμό ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων που θέλουμε να ξεχωρίσουμε. Με συγκέντρωση αγαρόζης 2% γίνεται διαχωρισμός τμημάτων DNA μήκους 0.1-3 Kb.

Για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των προϊόντων της αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται κυρίως βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), που έχει την ικανότητα να εκπέμπει φθορισμό λόγω σχηματισμού συμπλόκων παρεμβολής (intercalation) με το δίκλωνο DNA όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία (UV – γύρω στα 300 nm). Το όριο ανίχνευσης με αυτή την τεχνική είναι 10 ng DNA.

2.2.3.4. Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης 2%

- Ζυγίζονται 0,6 gr αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη
- Προστίθενται 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x
- Ταχεία θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη
- Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 4 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) ώστε να γίνει η τελική συγκέντρωση 1 μ g/ml και το διάλυμα αναδεύεται.

Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φθορίζουσα χρωστική το οποίο ενσωματώνεται στο δίκλωνο μόριο του προϊόντος της PCR, με αποτέλεσμα το DNA να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία με μέγιστο απορρόφησης μεταξύ 270-320 nm.

- Το διάλυμα χύνεται σε εκμαγείο, αφού πρώτα έχουν τοποθετηθεί σε αυτό “χτενάκια” ώστε να δημιουργηθούν “πηγαδάκια” καθώς το πήκτωμα της αγαρόζης πήζει.
- Το πήκτωμα αφήνεται να πήξει για 20 min
- Όταν το πήκτωμα της αγαρόζης έχει πήξει, αφαιρούνται τα “χτενάκια” και το εκμαγείο τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x μέχρι το σημείο που τα “πηγαδάκια” να καλύπτονται πλήρως από το διάλυμα.

2.2.3.5. Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Για την προετοιμασία αναμιγνύονται 3 μ L Loading Buffer με 4 μ L του προϊόντος της PCR από κάθε δείγμα και 3 μ L “δείκτη γνωστών μεγεθών” (DNA ladder 100bp).

2.2.3.6. Ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 80 -100 V για περίπου 30 min με ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες φως και φωτογραφίζεται με ψηφιακή κάμερα. Σε κάθε δείγμα φαίνεται μια ζώνη DNA, η οποία αντιπροσωπεύει το τμήμα του DNA που πολλαπλασιάστηκε με την PCR. Το μήκος του τμήματος του DNA ελέγχεται σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Για τον πολυμορφισμό ApoA-V -1131T>C, το μέγεθος του προϊόντος της PCR (PCR product) είναι 396 bp (ζεύγη βάσεων)

2.2.3.7. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR γίνεται για να μας δώσει DNA υψηλής καθαρότητας απαλλαγμένο από προσμίξεις με πρωτεΐνες, RNA ή άλλα

συστατικά ώστε να χρησιμοποιηθεί ακολούθως για πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Ο καθαρισμός γίνεται με εκχυλίσαις με φαινόλη – χλωροφόρμιο και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη αποσταγμένου νερού έως τα 100 μL στο υπόλοιπο προϊόν της PCR
2. Εκχύλιση με προσθήκη 50 μL φαινόλης και 50 μL χλωροφόρμιου για την πλήρη αποδιάταξη και απομάκρυνση των πρωτεϊνών
3. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 5 min για τον διαχωρισμό των φάσεων
4. Συλλογή της υδατικής φάσης σε φυγοκεντρικούς σωλήνες 1,5 ml και εκχύλιση με 100 μL χλωροφόρμιο για την απομάκρυνση της φαινόλης
6. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 5 min για τον διαχωρισμό των φάσεων
7. Συλλογή της υδατικής φάσης σε φυγοκεντρικούς σωλήνες 1,5 ml και προσθήκη 10 μL 3M CH_3COONa και αιθανόλης 100% ώστε να γίνει η τελική συγκέντρωση της 75% για κατακρήμνιση του DNA
9. Επώαση στους -20°C ολονύκτια ή στους -80°C για 20 min
10. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 20 min
11. Αφαίρεση όλου του υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος στους 55°C για 15 min
13. Επαναδιάλυση του DNA με την προσθήκη 20 μL αποσταγμένου νερού

2.2.3.8. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια, αναγνωρίζουν δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συνήθως μήκος από τέσσερα έως οκτώ νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες.

Τα τμήματα DNA που παράγονται από την πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες έχουν πάντα τα ίδια άκρα, είτε αυτά προεξέχουν (sticky ends), είτε όχι (blunt ends). Μια συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού θα κόψει σε μια σειρά συγκεκριμένων τμημάτων οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA. Τα

τμήματα αυτά ονομάζονται τμήματα περιορισμού (restriction fragments). Συγκρίνοντας το μέγεθος των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί από μια συγκεκριμένη περιοχή μετά την επεξεργασία της με έναν συνδυασμό διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, δημιουργείται ένας χάρτης περιορισμού (restriction map), ο οποίος δείχνει την τοποθεσία των θέσεων περιορισμού (restriction site).

Η διαφορά στους χάρτες περιορισμού μεταξύ ατόμων ή αλληλόμορφων τμημάτων DNA που προέρχονται από την ίδια περιοχή, οφείλεται σε νουκλεοτιδικές διαφορές και ονομάζεται πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP). Έτσι, η ανάλυση RFLP παρέχει το πλεονέκτημα του απ' ευθείας προσδιορισμού του γονότυπου ενός οργανισμού.

Επιπλέον, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλείο στη διαδικασία δημιουργίας ανασυνδυασμένων μορίων DNA που έχουν συμπληρωματικά άκρα.

Τα περιοριστικά ένζυμα ποικίλουν ως προς τις βέλτιστες συνθήκες δράσης τους, δηλαδή θερμοκρασία επώασης και σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος. Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας είναι αυστηρή. Τα ρυθμιστικά διαλύματα, εκτός από τη ρύθμιση του pH, περιέχουν συνήθως Mg^{+2} που λειτουργεί ως συμπράγοντας του ενζύμου. Τα συστατικά των διαλυμάτων επώασης πρέπει να είναι καθαρά και απαλλαγμένα από νουκλεάσες. Η προσθήκη BSA στην αντίδραση επώασης προφυλάσσει το ένζυμο από πρωτεάσες και άλλους παράγοντες. Το DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις που μπορεί να παρεμποδίζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου.

Για την πέψη των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *MseI* που αναγνωρίζει την αλληλουχία :



Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer solution) NEB2 (εταιρεία New England Biolabs, σύσταση: 50mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1mM Dithiothreitol, pH 7.9 25°C), BSA σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu g/ml$ και ο όγκος ρυθμίστηκε στα 15 μl με αποσταγμένο νερό.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της πέψης είναι η εξής:

1. Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα των αντιδραστηρίων της πέψης. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 5. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει πέψη, συν 1 ή παραπάνω δείγματα για τυχόν απώλειες.

Πίνακας 5. Μίγμα αντιδραστηρίων για την πέψη	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ (μL)
H ₂ O	8.15
Buffer NEB2 (10X)	1.50
BSA (1 mg/ml)	0.15
Ένζυμο <i>MseI</i> (10U/ml)	0.20

2. Από το μείγμα μεταφέρονται 10 μL στους φυγοκεντρικούς σωλήνες που περιέχουν 5 μL καθαρισμένου προϊόντος της PCR (25% της συνολικής ποσότητας). Ο συνολικός όγκος του μίγματος για την πέψη είναι 15 μL.

3. Οι φυγοκεντρικοί σωλήνες επωάζονται στους 37°C ολονύκτια

Έλεγχος του προϊόντος της πέψης

Ο έλεγχος του προϊόντος της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8%.

2.2.3.9. Προετοιμασία πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 8%

Η ακρυλαμίδα είναι ένα μονομερές που παρουσία ελευθέρων ριζών, που προέρχονται από το υπεροξυ-δισουλφικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) και οι οποίες σταθεροποιούνται με TEMED (N,N,N',N'-τετραμεθυλεθυλενδιαμίνη) και λειτουργούν ως καταλύτες, πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες. Όταν στην αντίδραση πολυμερισμού συμπεριλαμβάνεται και ο

παράγοντας bis – acrylamide (N,N'- μεθυλεν-δισακρυλαμίδη), οι αλυσίδες ενώνονται με την N,N'- μεθυλεν-δισακρυλαμίδη και σχηματίζουν την πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Το μήκος των αλυσίδων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης (από 3,5% έως 20%) στην αντίδραση πολυμερισμού. Επίσης, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της πηκτής πολυακρυλαμίδης εξαρτώνται από τη συγκέντρωση και το ποσοστό συμμετοχής της bis-ακρυλαμίδης : 1 μόριο συνδέτη απαιτείται για κάθε 29 μονομερή ακρυλαμίδης. Εάν υπάρχει πολύ bis-ακρυλαμίδη η πηκτή γίνεται ξηρή, ενώ εάν το bis είναι λιγότερο τότε η πηκτή γίνεται μυξώδης. Η ικανότητα διαχωρισμού των βάσεων DNA σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα με συγκέντρωση ακρυλαμίδης 8% (w/v) είναι από 60-400 ζεύγη βάσεων (bp).

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης παρασκευάζονται και πολυμερίζονται μέσα σε ένα ζεύγος γυάλινων πλακών (στην εργασία αυτή 20 cm x 20 cm), που χωρίζονται από ένα ζεύγος ισοπαχών spacers (2.0 mm). Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης σε σχέση με τα πηκτώματα αγαρόζης έχουν το βασικό πλεονέκτημα ότι μπορούν να διαχωρίσουν μόρια DNA των οποίων το μήκος διαφέρει κατά 0,2% (π.χ. κατά 1 bp στα 500 bp)

Τα μη αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης ηλεκτροφορούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) TBE 1x. Η επιλογή του Buffer καθορίζει τόσο το pH της πηκτής όσο και την ταχύτητα των μορίων που κινούνται μέσα στην πηκτή.

Απαραίτητο για την παρασκευή του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης είναι το μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%. Το μητρικό διάλυμα παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας 29 gr. ακρυλαμίδης και 1 gr. bis - ακρυλαμίδη που διαλύονται σε 60 ml ddH₂O και στη συνέχεια διηθούνται και συμπληρώνονται με ddH₂O έως τα 100 ml. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

Η παρασκευή πηκτώματος 50 ml πολυακρυλαμίδης 8% περιλαμβάνει τα εξής:

- Ζυγίζονται 6,4 gram ουρίας και τοποθετούνται σε κυλινδρικό σωλήνα με 20 ml ddH₂O σε συσκευή ανάδευσης
- Προστίθενται 6,6 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 10x και Το διάλυμα αναδεύεται

- Προστίθενται 13,3 ml μητρικού διαλύματος ακρυλαμίδης 30% και το διάλυμα αναδεύεται έως ότου διαλυθεί πλήρως
- Το διάλυμα διηθείται, συμπληρώνεται με ddH₂O έως τα 50 ml και προστίθενται 50 μL TEMED (N,N,N',N'- τετραμεθυλεθυλενδιαμίνη) που επιταχύνει τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης και της bis-ακρυλαμίδης καταλύοντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών από το υπεροξυ-δισουλφικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS).
- Προστίθενται επίσης 350 μL APS 20% που προμηθεύει τις ελεύθερες ρίζες που οδηγούν στον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης και της bis-ακρυλαμίδης.
- Το διάλυμα μεταφέρεται στη συσκευή της πηκτής ως το χείλος της όπου και τοποθετείται “κτενάκι” ώστε να δημιουργηθούν ειδικές θέσεις “πηγαδάκια” στην πηκτή όπου αργότερα τοποθετούνται τα δείγματα.
- Το διάλυμα αφήνεται να πήξει για ~30 min

2.2.3.10. Ηλεκτροφόρηση

- Καθαρίζονται τα “πηγαδάκια” της πηκτής από τυχόν υπολείμματα πολυακρυλαμίδης
- Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστίθεται το πήκτωμα και ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x (buffer) μέχρι να καλυφθούν τα “πηγαδάκια” τα οποία και ξεπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα.
- Σε 10 μL του προϊόντος πέψης προστίθενται 3 μL Loading Buffer. Επιπλέον ετοιμάζονται τα δείγματα του DNA ladder 100bp και 5 μL άκοπο προϊόν της PCR .
- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 250 V για περίπου 3 h
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα χρωματίζεται με νιτρικό άργυρο

2.2.3.11. Χρώση με Νιτρικό Αργυρο

Με τη μέθοδο αυτή, που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη, ανιχνεύονται μικρές ποσότητες νουκλεϊκών οξέων (λίγα ng). Η εμφάνιση των ζωνών DNA οφείλεται στην αναγωγή της ιονικής στη μεταλλική μορφή του αργύρου μέσω της φορμαλδεΰδης σε αλκαλικό pH. Όλα τα στάδια της μεθόδου πραγματοποιούνται υπό ανακίνηση. Η διαδικασία περιλαμβάνει:

- Αφαίρεση της πηκτής πολυακρυλαμίδης από το ζεύγος των γυάλινων πλακών και τοποθέτηση σε ζελατίνη
- Επώαση με διάλυμα που περιέχει 390 ml ddH₂O – 10 ml αιθανόλη 100% - 0,5 ml οξικό οξύ για σταθεροποίηση των νουκλεϊκών οξέων στην πηκτή.
- Ακολουθούν δύο πλύσεις της πηκτής, από 3 min η κάθε μια, με το διάλυμα σταθεροποίησης και μια πλύση με αποσταγμένο νερό για 1 min
- Επώαση με διάλυμα νιτρικού αργύρου (AgNO₃) 0.1% w/v για 10 min (200 ml)
- Απομάκρυνση του AgNO₃ και έκπλυση εις διπλούν της πηκτής με αποσταγμένο νερό
- Εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα χρώσης και ανάπτυξης χρώματος με διάλυμα που περιέχει 3 gr NaOH, 0,01 gr NaBH₄, 1 ml Na₂CO₃-φορμαλδεΰδη, για τουλάχιστον 10 min μέχρις ότου εμφανιστούν οι ζώνες των νουκλεϊκών οξέων
- Αφού εμφανιστούν οι ζώνες, η πηκτή εκπλένεται με αποσταγμένο νερό και φυλάσσεται. Οι ζώνες DNA εμφανίζονται χρωματισμένες με έντονο καφέ χρώμα⁷⁶.

Συγκεκριμένα, για το γονότυπο CC θα παρατηρηθεί προϊόν 105, 291 bp, για το TT 20, 105, 271 bp και για το CT 20, 105, 271, 291 bp.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

► **SDS 20% w/v**

- Sodium dodecyl sulphate 20 gr
- ddH₂O ως τα 100 ml

► **CH₃COONa 3M pH 5,2**

- CH₃COONa 24,6 gr
- ddH₂O ως τα 100 ml
- Ρύθμιση του pH στο 5,2
με διάλυμα υδροχλωρίου

► **TAE 50x (500 ml)**

- Tris base 121 gr
- Acetic acid 28,5 ml
- EDTA 0,5M 50 ml
- ddH₂O ως τα 500 ml

Για την παρασκευή διαλύματος TAE 1x,
αραιώνουμε το διάλυμα 50x
(49 όγκοι ddH₂O:1 όγκος TAE 50x)

► **Loading Buffer 6x (10 ml)**

- Bromophenol blue 1% w/v 1 ml
- TBE 10x 1 ml
- Glycerol 100% 5 ml
- ddH₂O ως τα 100 ml

► **Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)**

- 10 mg EtBr
- 1 ml ddH₂O

► **Διάλυμα ακρυλαμίδης 30%**

- Ακρυλαμίδη 99% 29 gr
- Δις-ακρυλαμίδη 1 gr
- ddH₂O ως τα 100 ml

► **TBE 10x (1 lt)**

- Tris base 108 gr
- Boric acid 55 gr
- EDTA 0,5M 40 ml
- ddH₂O ως το 1 lt

► **TBE 1x**

- 100 ml TBE 10x
- προσθήκη ddH₂O ως 1 lt

► **APS 20% w/v (10 ml)**

- Ammonium persulfate 2 gr
- ddH₂O ως τα 10 ml

► **TEMED**

2.2.3.12. Στατιστική Ανάλυση

Οι συχνότητες των αλληλόμορφων εκτιμήθηκαν με την μέθοδο καταμέτρησης των γονιδίων. Διεξήχθησαν δοκιμές χ^2 για να εξεταστεί κατά πόσον οι συχνότητες των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Για τον πολυμορφισμό ApoA-V -1131T>C, οι πληθυσμοί των ασθενών με Μεταβολικό σύνδρομο και των φυσιολογικών μαρτύρων μελετήθηκαν μη παραμετρικά , χρησιμοποιώντας 2 x 2 πίνακες συνάφειας, ομαδοποιώντας τους ετερόζυγους και τους ομόζυγους για το σπάνιο αλληλόμορφο σε κάθε περίπτωση και συγκρίνοντάς το με το ρίσκο της ομάδας του κοινού αλληλόμορφου. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p \leq 0.05$. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρησιμοποίηση των στατιστικών προγραμμάτων SPSS 14 και SISA (<http://home.clara.net/sisa/twoby2.htm>).

2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1. Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα

Τα άτομα που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκαν τυχαία, άσχετα με το φύλο τους. Συνολικά 51 άτομα συμμετείχαν (21 άνδρες και 30 γυναίκες από 5-72 ετών) από τα οποία τα 20 διαγνώστηκαν με Μεταβολικό Σύνδρομο (8 άνδρες και 12 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 39.65 ± 3.42 από 11-62 ετών). Η συγκέντρωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αποδεκτών προτύπων και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να γίνει η ανάλυση. Τα κύρια κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα από τα άτομα με Μεταβολικό Σύνδρομο και τα άτομα ελέγχου, συνοψίζονται στον Πίνακα 6. Επίσης ο ΔΜΣ των ατόμων με Μεταβολικό Σύνδρομο ήταν 38.72 ± 1.38 ενώ των ατόμων ελέγχου 30.51 ± 1.13 . Τα τριγλυκερίδια 201.95 ± 27.5 και 90.41 ± 8.11 αντίστοιχα, ενώ η HDL χοληστερόλη 42.8 ± 2.15 και 48.48 ± 2.93 για την κάθε ομάδα. Για τη διάγνωση του Μεταβολικού Συνδρόμου χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια της αναθεωρημένης έκδοσης του NCEP ATP III^{2,3}.

Συνολικά 31 άτομα (13 άνδρες και 18 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 25.38 ± 3.38 από 5-72 ετών) χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Ήταν υπέρβαρα και παχύσαρκα άτομα χωρίς όμως ιστορικό κάποιας ασθένειας.

Πίνακας 6. Κλινικές παράμετροι για τα άτομα με Μεταβολικό Σύνδρομο και για τα άτομα ελέγχου

	Άτομα με Μεταβολικό Σύνδρομο (20)	Άτομα Ελέγχου (31)
Φύλο (Α/Γ)	8/12	13/18
Ηλικία	39.65 ± 3.42	25.38 ± 3.38
ΔΜΣ (kg/m^2)	38.72 ± 1.38	30.51 ± 1.13
TG (mg/dL)	201.95 ± 27.5	90.41 ± 8.11
HDL (mg/dL)	42.8 ± 2.15	48.48 ± 2.93
Γλυκόζη (mg/dL)	102.8 ± 6.4	85.45 ± 1.03
ΣΠ	121.25 ± 7.3	89.51 ± 9.09
ΔΠ	73 ± 4.56	51.51 ± 5.26

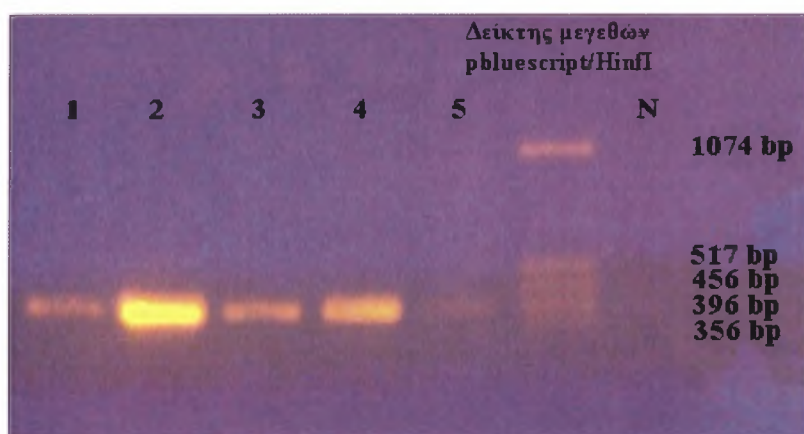
ΔΜΣ, Δείκτης Μάζας Σώματος, TG, Τριγλυκερίδια, HDL, Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, ΣΠ, Συστολική Πίεση, ΔΠ, Διαστολική Πίεση

2.3.2. Αποτελέσματα ανάλυσης γενωμικού DNA

Στη εργασία αυτή εφαρμόστηκε η μέθοδος PCR-RFLP με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του πολυμορφισμού -1131T>C του γονιδίου ApoA-V και τη συσχέτισή του με το Μεταβολικό Σύνδρομο.

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA που απομονώθηκε από 51 δείγματα ατόμων με καταγωγή από την Κεντρική Ελλάδα, υπέρβαρα και παχύσαρκα, με ή χωρίς Μεταβολικό Σύνδρομο. Ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης, αντίστοιχα. Η φωτομέτρηση έδειξε ότι η ποσότητα που λήφθηκε ήταν από 0,75 έως 11μg (συγκέντρωση: 7,5-110 ng/μL), που είναι αρκετή για την πραγματοποίηση τουλάχιστον 10 αντιδράσεων PCR, δεδομένου ότι σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 50-200 ng. Το υλικό αυτό ήταν καθαρό και ικανό να δώσει ικανοποιητικά προϊόντα PCR. Ο ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης έδειξε ότι το γενωμικό DNA ήταν μεγαλομοριακό και χωρίς θραύσματα μικρών μεγεθών (Μεταπτυχιακή Διατριβή Λ. Σκριάπα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Λάρισα 2010).

Με την PCR ενισχύθηκε τμήμα 396 bp του γονιδίου ApoA-V. Σε κάθε περίπτωση, το 10% του τελικού προϊόντος ελέγχονταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Προϊόντα PCR του γονιδίου ApoA-V. Τα δείγματα 1-5 αντιστοιχούν σε πέντε άτομα ελέγχου και το N στον αρνητικό έλεγχο της αντίδρασης.

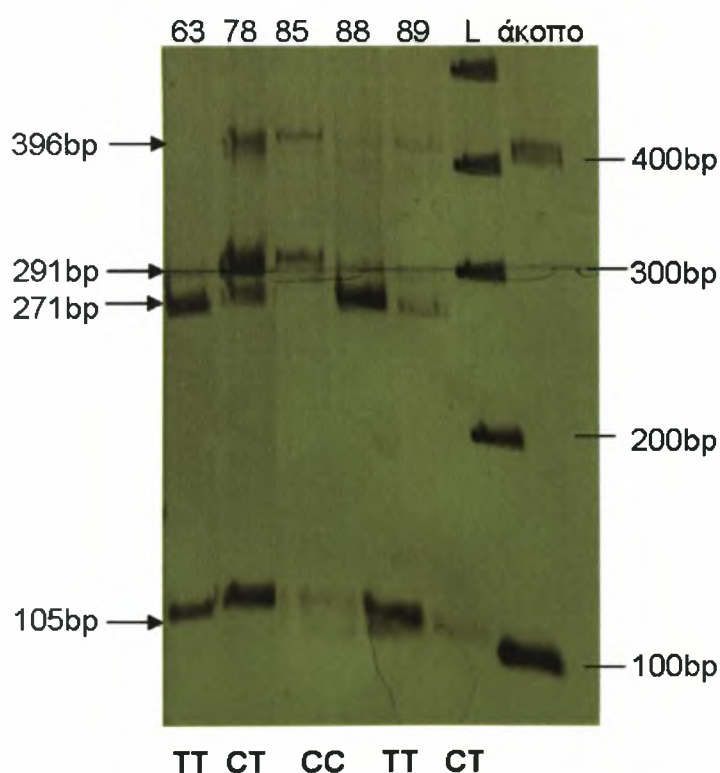
Στην συνέχεια και εφόσον το προϊόν της PCR ήταν ικανοποιητικό, δηλαδή παρουσίαζε μόνο μια ζώνη του αναμενόμενου μεγέθους, χωρίς την εμφάνιση

παραπροϊόντων, η ποσότητα ήταν διακριτή με το βρωμιούχο αιθίδιο και ο αρνητικός μάρτυρας δεν εμφάνιζε ζώνες προϊόντος, πραγματοποιήθηκε πέψη με ένζυμο περιορισμού (RFLP), για την ταυτοποίηση του πολυμορφισμού. Η εφαρμογή της PCR-RFLP στα 51 άτομα ελέγχου έδειξε 3 γονότυπους για το γονίδιο ApoA-V (T/T, C/T και C/C).

Μετά την πέψη του ApoA-V με την περιοριστική ενδονουκλεάση *MseI*, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης και χρώση.

Στην Εικόνα 10 παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικά από τα πρότυπα που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της RFLP για το τμήμα του γονιδίου ApoA-V. Για τον προσδιορισμό των συχνοτήτων των πολυμορφισμών του συγκεκριμένου τμήματος πραγματοποιήθηκε πέψη με τη χρήση του ενζύμου *MseI*, το οποίο πέπτει το τμήμα του γονιδίου σε 20, 105 και 271 bp.

Όπως μπορούμε να διακρίνουμε, τα άτομα είναι ομόζυγα (T/T) και δεν φέρουν τον πολυμορφισμό, ετερόζυγα (C/T) και φέρουν τον πολυμορφισμό και ομόζυγα (C/C) και φέρουν επίσης τον πολυμορφισμό.



Εικόνα 10: Ανάλυση RFLP του γονιδίου ApoA-V. Τα δείγματα 63 και 88 είναι ομόζυγα (T/T), τα δείγματα 78 και 89 είναι ετερόζυγα (C/T) και το 85^ο είναι ομόζυγο (C/C) για το SNP.

2.3.3. Αποτελέσματα για το γονίδιο ΑροΑ-V

Η ανάλυση των 51 δειγμάτων μας έδωσε 32 ομόζυγους γονότυπους ΤΤ χωρίς το σπάνιο αλληλόμορφο, 18 ετερόζυγους γονότυπους CT και 1 ομόζυγο γονότυπο CC που φέρουν το σπάνιο αλληλόμορφο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά για το κάθε δείγμα στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Συνολικά αποτελέσματα για το γονίδιο ΑροΑ-V

Κωδικός Δείγματος	Γονότυποι	Κωδικός Δείγματος	Γονότυποι
12/11/09: 4	ΤΤ	26/11/09: 31	ΤΤ
12/11/09: 6	ΤΤ	26/11/09: 81	ΤΤ
12/11/09: 7	ΤΤ	26/11/09: 80	ΤΤ
12/11/09: 9	ΤΤ	26/11/09: 74	ΤΤ
12/11/09: 10	ΤΤ	26/11/09: 57	CT
12/11/09: 11	ΤΤ	26/11/09: 56	CT
12/11/09: 13	ΤΤ	26/11/09: 55	CT
12/11/09: 14	CT	26/11/09: 49	CT
12/11/09: 15	CT	26/11/09: 86	CT
12/11/09: 16	CT	26/11/09: 76	CT
12/11/09: 17	ΤΤ	26/11/09: 72	ΤΤ
12/11/09: 18	CT	26/11/09: 48	CT
12/11/09: 19	ΤΤ	26/11/09: 67	CT
21/11/09: 20	ΤΤ	03/12/09: 36	ΤΤ
21/11/09: 29	ΤΤ	03/12/09: 62	ΤΤ
21/11/09: 35	ΤΤ	03/12/09: 63	ΤΤ
21/11/09: 40	ΤΤ	03/12/09: 64	CT
21/11/09: 45	ΤΤ	03/12/09: 78	CT
21/11/09: 50	ΤΤ	03/12/09: 84	CT
21/11/09: 60	ΤΤ	03/12/09: 1	CT
21/11/09: 73	ΤΤ	03/12/09: 66	ΤΤ
21/11/09: 77	ΤΤ	03/12/09: 85	CC
21/11/09: 83	ΤΤ	03/12/09: 88	ΤΤ
21/11/09: 87	ΤΤ	03/12/09: 89	CT
21/11/09: 12	ΤΤ	06/12/09: 5	ΤΤ
		06/12/09: 37	CT

2.3.4. Αποτελέσματα συσχέτισης του πολυμορφισμού T-1131C με το Μεταβολικό Σύνδρομο

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε για να καθορίσει τη σημασία του ApoA-V -1131T>C πολυμορφισμού ως πιθανού παράγοντα ρίσκου γενετικής προδιάθεσης για Μεταβολικό Σύνδρομο, παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p\leq0.05$. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φορείς του ApoA-V -1131C είχαν αυξημένο κίνδυνο για Μεταβολικό Σύνδρομο (OR=3.514, 95% CI: 1.065-11.585) . Η τιμή του p-value ($p=0.035$) βρέθηκε μέσα στα όρια του επιπέδου της στατιστικής σημαντικότητας που είχαμε θέσει, κάνοντας την υπόθεση της συσχέτισης περισσότερο ισχυρή. Παράλληλα τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το αλληλόμορφο ApoA-V -1131T δρα προστατευτικά όσον αφορά την εμφάνιση του Μεταβολικού Συνδρόμου.

Πίνακας 8. Μελέτη συσχέτισης μονού πολυμορφισμού σε πληθυσμούς ατόμων με Μεταβολικό Σύνδρομο και φυσιολογικών μαρτύρων

SNP	Δείγματα	Γονότυπος TT/CT/CC	Σύνολο	Συχνότητα (σπάνιου αλληλόμορφου)	Odds ratio* (CI95%)	p-value**
ApoA-V T-1131C	MetS	9/10/1	20	0.30	3.514 (1.065 - 11.585)	0.035
	Cnt	23/8/0	31	0.13		

* odds ratio : κατά προσέγγιση

** p-value [Fisher test]

Mets : άτομα με Μεταβολικό Σύνδρομο

Cnt : άτομα ελέγχου

2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκαν 51 άτομα από την Κεντρική και Νότιο Ελλάδα, υπέρβαρα και παχύσαρκα, στα οποία πραγματοποιήθηκαν ανθρωπομετρικές μετρήσεις, βιοχημικές εξετάσεις και γενετικός έλεγχος για τον πολυμορφισμό T-1131C του γονιδίου της ApoA-V. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η σχέση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με τον κίνδυνο εμφάνισης Μεταβολικού Συνδρόμου.

Το Μεταβολικό Σύνδρομο συνήθως σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων, μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης και αυξημένη αρτηριακή πίεση αίματος⁶⁻⁸. Πολλοί παράγοντες εμπλέκονται στην εμφάνισή του, όπως οι διατροφικές συνήθειες, η κατανάλωση οινοπνεύματος, το κάπνισμα, ο καθιστικός τρόπος ζωής καθώς και γενετικοί⁷⁴. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα των τριγλυκεριδίων μπορεί να οφείλονται σε μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια απολιποπρωτεϊνών όπως η ApoAI, ApoCIII, ApoAIV και ApoAV^{55,75}. Ανάμεσά τους, η ApoA-V και το πρόσφατα αναγνωρισμένο γονίδιο της ApoA-V, έχουν ρυθμιστικό ρόλο στον μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων^{47-50, 53-55}. Η ApoA-V επηρεάζει το μεταβολισμό τους με δύο μηχανισμούς. Μπορεί να ενισχύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων με το να ενεργοποιεί τη λιποπρωτεϊνική λιπάση ή να μειώνει τη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων καθυστερώντας την επανασύνδεση και επέκταση των VLDL.

Ο πολυμορφισμός του γονιδίου της ApoA-V μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία της μεταγραφής των πρωτεϊνών, τροποποιώντας τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης με αποτέλεσμα τα αυξημένα επίπεδα των τριγλυκεριδίων^{47,53}.

Το Μεταβολικό Σύνδρομο αυξάνει σημαντικά τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα από καρδιαγγειακές επιπλοκές¹¹. Πολλές πληθυσμιακές και προοπτικές μελέτες συσχετίζουν την παρουσία του με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιαγγειακές ασθένειες^{31-32,34,18}.

Στην παρούσα μελέτη μας εξετάσαμε τη συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό ApoA-V T-1131C και στον κίνδυνο εμφάνισης Μεταβολικού Συνδρόμου. Βρήκαμε στατιστική σημαντικότητα του αλληλόμορφου -1131C με το Μεταβολικό Σύνδρομο σε ασθενείς με Μεταβολικό Σύνδρομο. Ο τρόπος με τον

οποίο το σπάνιο αλληλόμορφο ApoA-V -1131C μπορεί να συνδέεται με το Μεταβολικό Σύνδρομο ενδεχομένως οφείλεται στο ότι η παρουσία του συνδέεται με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων. Το αλληλόμορφο ApoA-V -1131C έχει βρεθεί να σχετίζεται με αυξημένα τριγλυκερίδια σε αρκετές εθνότητες και με καρδιαγγειακές επιπλοκές όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου^{49,71-73}. Τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων είναι κοινά τόσο στο Μεταβολικό Σύνδρομο όσο και στο έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Σε μια σειρά από μελέτες, όπως αυτή του «The Dallas Heart Disease Prevention Program», στην οποία συμπεριλήφθηκαν τυχαία άτομα με μαύρη, λευκή και ισπανική καταγωγή, βρέθηκαν ισχυροί γενετικοί συσχετισμοί του -1131T>C πολυμορφισμού και των συγκεντρώσεων των τριγλυκεριδίων. Στη μελέτη The Prospective Erik-Norfolk Population Study, το σπάνιο αλληλόμορφο -1131C βρέθηκε να συσχετίζεται σημαντικά με υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και εμφανίζονταν σε μεγάλο βαθμό στην ομάδα των ατόμων με καρδιαγγειακές επιπλοκές⁷⁷.

Η συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων που αυξάνουν τον κίνδυνο για Μεταβολικό Σύνδρομο, επιβεβαιώνεται και από άλλες έρευνες. Συγκεκριμένα, σε μελέτη παιδιών σε σχολεία της Ιαπωνίας (Japanese School Children Study), τα παιδιά που έφεραν τον πολυμορφισμό, παρουσίαζαν αύξηση των τριγλυκεριδίων τους σε ποσοστό 15%⁷⁸. Επιπρόσθετα, οι Giriraj και συνεργάτες⁷⁹ έδειξαν ότι η παρουσία του πολυμορφισμού σχετίζονταν με αυξημένα τριγλυκερίδια σε δείγμα Βρετανών ατόμων, ενώ η ερευνητική ομάδα του Ishihara⁸⁰ παρατήρησε υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων στους φορείς του πολυμορφισμού. Επίσης, σε μια άλλη ερευνητική μελέτη σε δείγμα Κινέζων, Μαλαισιανών και Ινδών της Σιγκαπούρης καταγράφηκε ανάλογη αύξηση των επιπέδων τριγλυκεριδίων στο πλάσμα παρουσία του πολυμορφισμού -1131T>C⁸, ενώ οι Maasz και συνεργάτες⁷³ βρήκαν ισχυρή συσχέτιση του πολυμορφισμού με αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση υπετριγλυκεριδαιμίας και Μεταβολικού Συνδρόμου. Τέλος στη μελέτη «Framingham Heart Study», βρέθηκαν επίσης ισχυροί συσχετισμοί των συγκεντρώσεων των τριγλυκεριδίων τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες με τον πολυμορφισμό -1131T>C⁷¹.

Στη μελέτη μας, αν και το δείγμα των ατόμων που μελετήθηκε ήταν μικρό, και το εύρος των ηλικιών μεγάλο, υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού - 1131T>C με αυξημένο κίνδυνο για Μεταβολικό Σύνδρομο, χωρίς βέβαια αυτό να αποκλείει την πιθανότητα ενός ψευδώς θετικού αποτελέσματος, μιας

και γνωρίζουμε ότι η συχνότητα εμφάνισης του Μεταβολικού Συνδρόμου αυξάνεται κυρίως από τη μέση ηλικία και πάνω.

Ωστόσο, είναι ένα σημαντικό εύρημα που πρέπει να μας ωθήσει να επεκτείνουμε την παρούσα μελέτη σε μεγαλύτερο πληθυσμιακό δείγμα και να ερευνήσουμε την επίδραση του πολυμορφισμού σε βιοχημικούς και σωματομετρικούς δείκτες αλλά και να μας κάνει περισσότερο αποφασιστικούς για παρεμβάσεις στον τρόπο ζωής και στις διατροφικές μας συνήθειες .

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη, προέκυψε ότι ο πολυμορφισμός -1131T>C σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για Μεταβολικό Σύνδρομο. Παράλληλα όμως, θα πρέπει να συνεκτιμηθούν διατροφικοί και άλλοι παράγοντες, προκειμένου να χαρακτηριστεί ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός ως γενετικός δείκτης του Μεταβολικού Συνδρόμου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Reaven GM.** Banting Lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; **37**:1595-607.
2. **National Cholesterol Education Program (NCEP): Expert Panel on Detection and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults** (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **106**, 3143-4321.
3. **Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B.A., Gordon, D. J., Krauss, R. M., Savage, P. J., Smith, S. C., Jr et al.** (2005).
Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute scientific statement. *Circulation* **112**, 2735-2752.
4. **Alberti, K. G. and Zimmet, P. Z.** (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* **15**, 539-553.
5. **Balkau, B. and Charles, M. A.** (1999). Comment on the provisional report from the WHO consultation: European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet.Med.* **16**, 442-443.
6. **Zimmet, P., Magliano, D., Matsuzawa, Y., Alberti, G. and Shaw, J.** (2005). The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J.Atheroscler. Thromb.* **12**, 295-300.
7. **Reaven, G. M.** (2006). The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? *Am. J. Clin.Nutr.* **83**, 1237-1247.
8. **Huang, P. L.** (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms* **2**, 231-237
9. **Pervanidou P., Kanaka-Gantenbein C., Papasotiriou J., Chrousos G.P.** (2007). Assessment of metabolic syndrome and obesity in children and adolescents. *Ann Clin Paediatr.* **54**(1):41-52)
10. **Zimmet P., Alberti K George MM, Kaufman F., Tajima N., Silink M., Arslanian S., Wong G., Bennett P., Shaw J., Caprio S.** (2007). The metabolic syndrome in children and adolescents – an IDF consensus report. *Pediatric Diabetes* **8**: 299-306
11. **DCW Law, H. Yan, B. Dhillon** (2006). Metabolic syndrome: A marker of patients at high cardiovascular risk. *Can J Cardiol* **22**(Suppl B):85B-90B.
12. **Ford ES** (2005). Prevalence of the metabolic syndrome defined dh the International Diabetes Federation among adults in the US. *Diabetes Care* **28**: 2745-2749.
13. **Gerard T Chew, Seng Khee Gan, Gerald F Watts** (2006). Revisiting the metabolic syndrome. *MJA* **185**:8
14. **Adams RJ, Appleton S, Wilson DH, et al** (2005). Population comparison of two clinical approaches to the metabolic syndrome: implications of the new International Diabetes Federation consensus definition. *Diabetes Care* **28**: 2777-2779
15. **Ford ES, Giles WH, Mokdad AH** (2004). Increasing prevalence of the metabolic syndrome among US adults. *Diabetes Care* **27**: 2444-2449.

16. **Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB.** (2003). The metabolic syndrome: Prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutritional Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* **163**:427-36.
17. **Jago R., Baranowski T., Buse J., Edelstein S., Galassetti P., Harrell J., Kaufman F., Linder B., Pham T.** (2008). Prevalence of the Metabolic Syndrome Among a Racially/Ethnically Diverse Group of U.S. Eighth-Grade Adolescents and Associations With Fasting Insulin and Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance Levels. *Diabetes Care* **31**: 2020-2025
18. **Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K, Pyorala K; DECODE Study Group** (2004). Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in non-diabetic European men and women. *Arch Intern Med.* **164**:1066-1076.
19. **Panagiotakos DB, Pitsavos CH, Chryschoou C, Skoumas J, Tousoulis D, Toutouza M, Toutouzas PK, Stefanadis C.** (2004). The Impact of Lifestyle Habits on the Prevalence of the Metabolic Syndrome among Greek adults from the ATTICA study. *Am Heart J* **147**:106-112.
20. **Athyros VG, Ganotakis ES, Elisaf M, Mikhailidis DP** (2005). The prevalence of the metabolic syndrome using the National Cholesterol Educational Program and International Diabetes Federation definitions. *Curr Med Res Opin.* **21**:1157-1159.
21. **Sidiropoulos P., Karvounaris S.A., Boumpas D.T.** (2008). Metabolic syndrome in rheumatic diseases: epidemiology, pathophysiology, and clinical implications. *Arthritis Research & Therapy* **10**:207
22. **Kim, J. A., Montagnani, M., Koh, K. K. and Quon, M. J.** (2006). Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* **113**, 1888-1904.
23. **Jonk, A. M., Houben, A. J., de Jongh, R. T., Serne, E. H., Schaper, N. C. and Stehouwer, C. D.** (2007). Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Physiology (Bethesda)* **22**, 252-260.
24. **Kershaw, E. E. and Flier, J. S.** (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2548-2556.
25. **Semenkovich, C. F.** (2006). Insulin resistance and atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **116**, 1813-1822.
26. **Huang, P. L.** (2005). Unraveling the links between diabetes, obesity, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* **96**, 1129-1131.
27. **Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. and Zeiher, A. M.** (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-605.
28. **Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C.** (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**, 597-601.
29. **Beckman, J. S. and Koppenol, W. H.** (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* **271**, C1424-C1437.
30. **Atochin, D. N., Wang, A., Liu, V. W., Critchlow, J. D., Dantas, A. P., Looft-Wilson, R., Murata, T., Salomone, S., Shin, H. K., Ayata, C. et al.** (2007). The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **117**, 1961-1967.

31. **Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM.** (2003). NCEP defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* **52**:1210-4.
32. **Sattar N, Gaw A, Scherbakova O.** (2003). Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* **108**:414-9.
33. **Wilson PW, Kannel WB, Silbershatz H, D'Agostino RB** (1999). Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* **159**:1104-9.
34. **Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al** (2002). The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middleaged men. *JAMA* **288**:2709-16.
35. **Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, et al** (2003). Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: A randomized trial. *JAMA* **289**:1799-804.
36. **Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM** (2001). Energy restriction and weight loss on very-low-fat diets reduce C-reactive protein concentrations in obese, healthy women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**:968-70.
37. **Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB** (1999). Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* **282**:2131-5.
38. **Ridker PM** (2003). Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* **107**:363-9.
39. **Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S** (2005). Adipokines: Molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**:H2031-41.
40. **Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N.** (2003). C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: An 8-year follow-up of 14,719 initially healthy American women. *Circulation* **107**:391-7.
41. **Pischon T., Hu B. F., Rexrode M. K., Girman J. C., Manson E. J., Rimm B. E.** (2008). Inflammation, the Metabolic Syndrome, and Risk of Coronary Heart Disease in Women and Men. *Atherosclerosis* **197**(1):392-399
42. **Lau DC. Adipose tissue growth and differentiation** (2000): View from the chair. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**(Suppl 4):S20-2.
43. **Ahima R, Flier JS** (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* **11**:327-32.
44. **Lau D, Yan H, Abdel-Hafez M, Kermouni A.** (2002). Adipokines and the paracrine control of their production in obesity and diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**(Suppl 1):S111.
45. **Dhillon B, Yan H, Wang Y, et al** (2004). Adipose tissue is a source and modulator of C-reactive protein expression. *Can J Diabetes* **28**:252.
46. **Dhillon B, Yan H, Wang Y, et al** (2004). Characterization of C-reactive protein mRNA levels in lean and obese human adipose tissue. *Obesity Res* **12**(Suppl):A21.

47. **Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA et al.** (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* **294**, 169–173.
48. **Wong K & Ryan RO** (2007) Characterization of apolipoprotein A-V structure and mode of plasma triacylglycerol regulation. *Curr Opin Lipidol* **18**, 319–324.
49. **Elosua R, Ordovas JM, Cupples LA et al.** (2006) Variants at the APOA5 locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study. *J LipidRes* **47**, 990–996.
50. **Tai ES & Ordovas JM** (2008) Clinical significance of apolipoprotein A5. *Curr Opin Lipidol* **19**, 349–354.
51. **Kotsovassilis C, Bei A. T.** (2003) Lipoproteins and atherosclerosis. *Archives of Hellenic Medicine* **20**(4):384–406
52. **Hendrik N. van der Vliet, Martijn Groenink Sammels, Aad C.J. Leegwater, Johannes H.M. Levels, Pieter H. Reitsma, Willem Boers, and Robert A.F.M. Chamuleau** (2001). Apolipoprotein A-V: A novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *The Journal of Biological Chemistry*; vol **276**, No. 48:44512–44520
53. **Pennacchio LA, Rudin EM** (2003). Apolipoprotein A5, a Newly Identified Gene That Affects Plasma Triglyceride Levels in Humans and Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **23**, 529–534
54. **Jakel H, Nowak M, Helleboid-Chapman A, Fruchart-Najib J, Fruchart JC** (2006). Is apolipoprotein A5 a novel regulator of triglyceride-rich lipoproteins? *Annals of Medicine* **38**:2–10
55. **Mar, R., et al.** (2004). Association of the APOLIPOPROTEIN A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride levels and LDL particle size in familial combined hyperlipidemia. *Circ.Res.* **94**:993–999.
56. **Richard B. Weinberg, Victoria R. Cook, Jennifer A. Beckstead, Dale D. O. Martin, James W. Gallagher, Gregory S. Shelness, and Robert O. Ryan** (2003). Structure and Interfacial Properties of Human Apolipoprotein A-V. *The Journal of Biological Chemistry* Vol **278**, No. 36: 34438–34444.
57. **Merkel, M., et al.** (2005). Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan bound lipoprotein lipase. *J.Biol. Chem.* **280**:21553–21560.
58. **Schaap, F.G., et al.** (2004). ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein- triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipasemediated VLDL-TG hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **279**:27941–27947.
59. **Olofsson, S.O.** (2005). ApoA-V: the regulation of a regulator of plasma triglycerides. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**:1097–1099.
60. **Martin Merkel and Joerg Heeren** (2005). Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! *J. Clin. Invest.* **115**:2694–2696
61. **Richard B. Weinberg, Victoria R. Cook, Jennifer A. Beckstead, Dale D. O. Martin, James W. Gallagher, Gregory S. Shelness, and Robert O. Ryan** (2003). Structure and Interfacial Properties of Human Apolipoprotein A-V. *The Journal of Biological Chemistry* Vol **278**, No. 36: 34438–34444.
62. **Patrick C.N. Rensen, Ko Willems van Dijk and Louis M. Havekes** (2005). Apolipoprotein AV: Low Concentration, High Impact. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**:2445–2447

63. **Michael Olivier, Xujing Wang, Regina Cole, Brian Gau, Jessica Kim, Edward M. Rubinc, Len A. Pennacchio** (2004). Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. *Genomics* **83**(5): 912–923
64. **Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC**(2002). Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet.* **11**:3031-8
65. **Philippa J. Talmud, Jutta Palmen, Wendy Putt, Laurence Lins, and Steve E. Humphries** (2005). Determination of the Functionality of Common *APOA5* Polymorphisms. *The Journal of Biological Chemistry* Vol.**280**, No.31:28215-28220.
66. **van der Vleuten G, Isaacs A, Zeng W, Avest E, Talmud P, Dallinga-Thie G, et al.** (2007). Haplotype analyses of the *APOA5* gene in patients with familial combined hyperlipidemia. *Biochim Biophys Acta* **1772**:81e8.
67. **Kisfali P, Mohas M, Maasz A, Polgar N, Hadarits F, Marko L, Brasnyo P, Horvatovich K, Oroszlan T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztanyi B, Rinfel J, Wittmann I, Melegh B.** (2009). Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with the metabolic syndrome. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* xx,1-7, doi:10.1016/j.numecd.2009.05.001
68. **Eichenbaum-Voline, S., Olivier, M., Jones, E. L., Naoumova, R. P., Jones, B., Gau, B., Patel, H. N., Seed, M., Betteridge, D. J., Galton, D. J., Rubin, E. M., Scott, J., Shoulders, C.C., and Pennacchio, L. A.** (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 167–174
69. **Olano-Martin E, Abraham EC, Gill-Garrison R et al.**(2008) Influence of apoA-V gene variants on postprandial triglyceride metabolism: impact of gender. *J Lipid Res* **49**, 945–953.
70. **Moreno-Luna R, Perez-Jimenez F, Marin C et al.** (2007) Two independent apolipoprotein A5 haplotypes modulate postprandial lipoprotein metabolism in a healthy Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 2280–2285.
71. **Lai CQ, Demissie S, Cupples LA, Zhu Y, Adiconis X, Parnell LD, et al.** (2004). Influence of the *APOA5* locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study. *J Lipid Res.* **45**:2096-105
72. **Bi N, Yan SK, Li GP, Yin ZN, Chen BS** (2004) . A single nucleotide polymorphism -1131T>C in the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and alters triglyceride metabolism in Chinese. *Mol Genet Metab.* **83**:280-6
73. **Maasz A, Kisfali P, Horvatovich K, Mohas M, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, Magyari L, Safrany E, Sipeky C, Wittmann I, Melech B.** (2007). Apolipoprotein A5 T-1131C Variant Confers Risk for Metabolic Syndrome. *Pathology Oncology Research* Vol **13**:3:243-247
74. **Yamada Y, Kato K, Hibino T, Yokoi K, Matsuo H, Segawa T, et al** (2007). Prediction of genetic risk for metabolic syndrome. *Atherosclerosis* **191**:298e304.
75. **Dallongeville J, Cottel D, Montaye M, Codron V, Amouyel P, Helbecque N.** (2006) Impact of *APOA5/A4/C3* genetic polymorphisms on lipid variables and cardiovascular disease risk in Frenchmen. *Int J Cardiol* **106**:152e6.
76. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

77. **Stefan F. C. Vaessen, Frank G. Schaap, Jan-Albert Kuivenhoven, Albert K. Groen, Barbara A. Hutten, S. Matthijs Boekholdt, Hiroaki Hattori, Manjinder S. Sandhu, Sheila A. Bingham, Robert Luben, Jutta A. Palmen, Nicholas J. Wareham, Steve E. Humphries, John J. P. Kastelein, Philippa J. Talmud, and Kay-Tee Khaw** (2006). Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic- Norfolk Population Study. *J. Lipid Res* **47**: 2064–2070.
78. **Endo K, Yanagi H, Araki J, Hirano C, Yamakawa-Kobayashi K, Tomura S.** (2002). Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. *Hum Genet.* **111**:570-572
79. **Giriraj R Chandak†, Kirsten J Ward†, Chittaranjan S Yajnik†, Anand N Pandit, Ashish Bavdekar, Charu V Joglekar, Caroline HD Fall, P Mohankrishna, Terence J Wilkin, Bradley S Metcalf, Michael N Weedon, Timothy M Frayling² and Andrew T Hattersley** (2006). Triglyceride associated polymorphisms of the *APOA5* gene have very different allele frequencies in Pune, India compared to Europeans. *BMC Medical Genetics* **7**:76
80. **Ishihara, M., T. Kujiraoka, T. Iwasaki, M. Nagano, M. Takano, J. Ishii, M. Tsuji, H. Ide, I. P. Miller, N. E. Miller, and H. Hattori** (2005). A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A-V concentration. *J. Lipid Res.* **46**: 2015–2022.
81. **Lai, C-Q., E-S. Tai, C. E. Tan, J. Cutter, S. K. Chew, Y-P. Zhu, X. Adiconis, and J. M. Ordovas** (2003). The *APOA5* locus is a strong determinant of plasma triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore. *J. Lipid Res.* **44**: 2365–2373.